Trousse universelle MiSeqDx(MC) 1.0

DESTINÉ AUX DIAGNOSTICS IN VITRO UNIQUEMENT

N° de référence DX-103-1001: 2 analyses, jusqu'à 96 échantillons par trousse

Utilisation prévue

La Trousse universelle Illumina MiSeqDx 1.0 est un ensemble de réactifs et de consommables utilisé à la fois dans le traitement d'échantillons ADN génomique humain provenant de sang total périphérique et dans le séquençage ciblé ultérieur des librairies d'échantillons qui en découlent. Les réactifs spécifiques aux analytes fournis par l'utilisateur sont nécessaires pour la préparation des librairies ciblant des régions génomiques d'intérêt spécifiques. La Trousse universelle MiSeqDx 1.0 est destinée à être utilisée avec l'instrument MiSeqDx.

Principes procéduraux

La plateforme Illumina MiSeqDx, composée de la Trousse universelle MiSeqDx 1.0 et de l'instrument MiSeqDx, est conçue pour le séquençage ciblé d'ADN génomique humain d'après des échantillons de sang total périphérique. À l'aide de réactifs contenus dans le Trousse universelle MiSeqDx 1.0, l'ADN génomique est traité à travers les étapes de préparation de la librairie, qui amplifient spécifiquement les régions génomiques prévues de chaque échantillon en utilisant les oligonucléotides personnalisés conçus par l'utilisateur, tout en ajoutant les index et les séquences de saisie pour les produits amplifiés. Les librairies d'échantillons obtenues sont prêtes pour le séquençage sur l'instrument Illumina MiSeqDx.

L'utilisation de la Trousse universelle Illumina MiSeqDx 1.0 comporte trois principales procédures pour lesquelles tous les réactifs sont fournis à l'exception des oligonucléotides personnalisés. La première procédure est la préparation de la librairie, qui prépare manuellement les échantillons pour le séquençage. La préparation de la librairie comporte quatre étapes clés : l'hybridation, l'extension-ligation, l'amplification par PCR et la normalisation de librairie. La deuxième procédure est de séquencer l'échantillon préparé en utilisant la chimie SBS (séquençage par synthèse) sur le MiSeqDx. La troisième procédure utilise le logiciel d'analyse pour analyser les résultats de séquençage et générer des fichiers au format Variant Call Format (VCF) contenant des appels de variants pour chaque échantillon. Les renseignements nécessaires pour configurer et analyser une analyse de séquençage, y compris une liste des échantillons et leurs séquences d'index, sont détaillés dans un fichier de feuille d'échantillons à valeurs séparées par des virgules (*.csv).

Préparation de la librairie

- **Hybridation** : hybride un groupe d'oligonucléotides en amont et en aval spécifiques aux régions d'intérêt en échantillon d'ADN génomique. À la fin du processus, une procédure de lavage en trois étapes avec un filtre capable de sélectionner la taille retire les oligonucléotides non liés de l'ADN génomique.
- **Extension-Ligation** : relie les oligonucléotides en amont et en aval hybridés. Un ADN polymérase s'étend des oligonucléotides en amont à travers la région ciblée, suivi par une ligation à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide en aval à l'aide d'un ADN ligase. Le résultat est la formation de produits contenant des oligonucléotides spécifiques aux régions d'intérêt bordés par les séquences nécessaires pour l'amplification.
- **Amplification par PCR** : amplifie les produits de l'extension-ligation à l'aide des primers qui ajoutent des séquences d'index pour le multiplexage des échantillons, tout comme les séquences de saisie de Flow Cell nécessaires à la génération d'amplifiats sur le MiSeqDx. À la fin de ce processus, une procédure de nettoyage PCR purifie les produits PCR (désignés comme une librairie).

- **Normalisation de librairie** : normalise la quantité de chaque librairie pour assurer une représentation plus égale des librairies dans la dernière librairie regroupée. À la fin de ce processus, la librairie regroupée est chargée dans le MiSeqDx pour le séquençage à l'aide de la chimie de séquençage par synthèse (SBS).

Séquençage

La chimie SBS utilise la méthode basée sur des terminateurs réversibles pour détecter les bases de nucléotides uniques à mesure qu'elles sont intégrées aux brins d'ADN croissants. Pendant chaque cycle de séquençage, un seul triphosphate de déoxynucléotide marqué par fluorescence (dNTP) est ajouté à la chaîne d'acide nucléique. Le marqueur nucléotidique sert de terminateur pour la polymérisation, ainsi après chaque incorporation de dNTP, le colorant fluorescent est imagé pour identifier la base, puis enzymatiquement fendu pour permettre l'incorporation du prochain nucléotide. Étant donné que tous les quatre dNTP liés à des terminateurs réversibles (A, G, T, C) sont présents comme molécules seules et séparées, la compétition naturelle minimise le biais lié à l'incorporation. Les définitions de base sont faites directement à partir des mesures d'intensité de signal pendant chaque cycle de séquençage. Le résultat final est le séquençage base par base.

Analyse

Le logiciel intégré d'analyse primaire en temps réel (RTA) exécute les analyses d'images et la définition des bases, et affecte également un score de qualité à chacune des bases de chaque cycle de séquençage. Une fois l'analyse primaire terminée, le logiciel MiSeq Reporter sur l'instrument MiSeqDx lance une analyse secondaire. MiSeq Reporter traite les définitions de base générées pendant l'analyse primaire et fournit des renseignements sur chaque échantillon en fonction des renseignements indiqués dans la feuille d'échantillons. L'analyse secondaire comprend le démultiplexage, la génération de fichier FASTQ, l'alignement, la définition de variant et la génération des fichiers VCF contenant des renseignements sur les variants trouvés dans des positions spécifiques d'un génome de référence.

Limites de la procédure

1. Destiné au diagnostic *in vitro* uniquement.
2. Ce produit se limite à fournir :
   - Sortie de séquençage > 1Gb
   - Lectures > 3 millions
   - Longueur de lecture (en analyse à lecture appariée) 2 × 150 bp
   - Bases supérieures à Q30 > 75 % (plus de 75 % des bases ont un score de qualité Phred supérieur à 30, indiquant une précision de définition de bases supérieure à 99,9 %)
3. Le système a été validé pour la détection de SNV et jusqu'à 3 suppressions de base. L'évaluation d'insertions de base 1 a été limitée à 3 insertions différentes sur 3 chromosomes distincts.
4. Le système a des problèmes de détection des insertions de base 1 ou des suppressions d'enchaînements homopolymériques (par exemple, ployA).
5. Le système MiSeqDx est conçu pour offrir des résultats qualitatifs (c.-à-d. de génotype).
6. Comme avec n'importe quel flux de travail à base d'hybridation, les polymorphismes ou mutations sous-jacents dans les régions de liaison d'un oligonucléotide peuvent affecter les allèles sondés et, par conséquent, les appels réalisés.
7. La couverture minimale recommandée par amplicon nécessaire pour un appel de variants précis (Q(max_gt | poly_site) > = 100) est de 75 ×.

Composants du produit

Le Trousse universelle Illumina MiSeqDx 1.0 comprend les composants suivants :

- Trousse universelle MiSeqDx 1.0 (Nº de référence DX-103-1001)

Réactifs

Réactifs fournis

La Trousse universelle Illumina MiSeqDx 1.0 a été configurée pour 2 analyses avec un maximum de 48 échantillons par analyse (jusqu'à 96 échantillons au total). Consultez les tableaux ci-dessous pour une liste complète des réactifs fournis dans cette trousse.

Trousse universelle MiSeqDx 1.0, boîte 1

Table 1 Boîte 1A : réactifs de pré-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Tampon d'hybridation	1 tube	4,32 mL	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et du formamide	-15 à -25 °C
Mélange extension-ligation	1 tube	4,8 mL	Solution aqueuse tamponnée contenant un mélange exclusif d'ADN polymérases, d'ADN ligase et des dNTP	-15 à -25 °C
Primers d'indexage A (A501) - H (A508)	1 tube par primer	192 µl	Primers PCR avec des séquences d'indexage et des adaptateurs de séquençage	-15 à -25 °C
Primers d'indexage 1 (A701) - 12 (A712)	1 tube par primer	128 µl	Primers PCR avec des séquences d'indexage et des adaptateurs de séquençage	-15 à -25 °C
Polymérase PCR	1 tube	56 µl	ADN polymérase exclusive	-15 à -25 °C
Mélange maître PCR	1 tube	2,8 mL	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des dNTP	-15 à -25 °C

Table 2 Boîte 1B : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Diluant de normalisation de librairie	1 tube	4,6 mL	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, du 2-mercaptoéthanol et du formamide	-15 à -25 °C
Tampon de dilution de librairie	1 tube	4,5 mL	Solution aqueuse tamponnée	-15 à -25 °C
Contrôle interne PhiX	1 tube	10 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant de l'ADN génomique PhiX	-15 à -25 °C

Trousse universelle MiSeqDx 1.0, boîte 2

Table 3 Boîte 2 : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Contenu	Stockage
Cartouche de réactifs MiSeqDx	2 cartouches	Cartouche à usage unique contenant une génération d'amplifiats et des réactifs de séquençage pour une utilisation avec le MiSeqDx, comprenant du formamide, du 2-mercaptoéthanol et < 2 % de DMSO	-15 à -25 °C

Trousse universelle MiSeqDx 1.0, boîte 3

Table 4 Boîte 3A : réactifs de pré-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Tampon de lavage strict	1 flacon	24 mL	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, du 2-mercaptoéthanol et du formamide	2 à 8 °C
Tampon de lavage universel	1 tube	4,8 mL	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	2 à 8 °C

Table 5 Boîte 3B : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Billes de nettoyage PCR	1 tube	5 mL	Solution aqueuse tamponnée contenant des billes paramagnétiques en phase solide et du polyéthylène glycol	2 à 8 °C
Lavage de normalisation de librairie	2 tubes	4,8 mL	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, du 2-mercaptoéthanol et du formamide	2 à 8 °C
Billes de librairie	1 tube	1,2 mL	Solution aqueuse tamponnée contenant des billes paramagnétiques en phase solide	2 à 8 °C
Flow Cell MiSeqDx	2 conteneurs	1 Flow Cell	Substrat en verre avec des oligonucléotides liés par covalence	2 à 8 °C

Trousse universelle MiSeqDx 1.0, boîte 4

Table 6 Boîte 4 : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Solution SBS (PR2) MiSeqDx	2 flacons	353,1 mL	Solution aqueuse tamponnée	2 à 8 °C

Trousse universelle MiSeqDx 1.0, boîte 5

Table 7 Boîte 5 : réactifs de pré-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Plaque filtrante	2 plaques	S.O.	Plaque de microtitration en polypropylène avec une membrane en polyéthersulfone modifiée	15 à 30 °C

Table 8 Boîte 5 Réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Tampon d'élution	1 tube	4,8 mL	Solution aqueuse tamponnée	15 à 30 °C
Tampon de stockage de librairie	1 tube	3,5 mL	Solution aqueuse tamponnée	15 à 30 °C

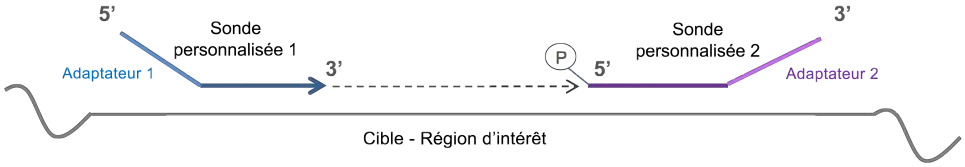
Réactifs nécessaires, non fournis

Pool d'oligos personnalisé

Les oligonucléotides spécifiques au primer sont conçus pour être développés par l'utilisateur et ne sont pas inclus dans la trousse de préparation de la librairie. La Figure 1 illustre le principe de conception de l'oligo personnalisé. La conception de l'oligo doit respecter les exigences suivantes :

- Une paire d'oligonucléotides personnalisés doit être conçue pour chaque amplicon : une sonde personnalisée 1 (oligonucléotide locus spécifique en amont [ULSO]) et une sonde personnalisée 2 (oligonucléotide locus spécifique en aval [DLSO]).
- Les oligos personnalisés doivent entourer la région d'intérêt. Celle-ci peut comporter entre 150 et 250 bp pour permettre un séquençage complet du fragment à l'aide de la trousse 2 x 150.
- Les deux oligonuécléotides doivent s'hybrider avec le même brin d'ADN.
- Les oligos personnalisés doivent contenir les adaptateurs propres à Illumina pour permettre l'ajout d'indices ainsi que des adaptateurs de séquençage par PCR.
  - L'adaptateur 1 (5'- CAACGATCGTCGAAATTCGC-3') doit être situé à l'extrémité 5' de la sonde personnalisée 1 (ULSO).
  - L'adaptateur 2 (5'- AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA-3') doit être situé à l'extrémité 3' de la sonde personnalisée 2 (ULSO).
- La sonde personnalisée 2 (DLSO) est phosphorylée à l'extrémité 5' pour prendre en charge l'étape de ligation après l'extension de la sonde personnalisée 1 (ULSO).

Figure 1 Conception de l'oligo pour la Trousse universelle MiSeqDx 1.0



- Les paramètres de conception de l'oligo suivants sont recommandés :
  - Longueur de la sonde comprise entre 22 et 30 nucléotides (région spécifique aux gènes).
  - Taille totale de l'amplicon comprise entre 190 et 290 paires de bases, adaptateurs compris.
  - La teneur en GC recommandée du primer doit être comprise entre 25 et 70 %.
  - Plage de fusion recommandée entre 55 et 70 °C.
  - La concentration du primer doit être de 15 nM par oligo dans le pool personnalisé.
  - Aucune purification supplémentaire de l'oligo n'est nécessaire à l'issue de la synthèse. Un dessalage est recommandé.
  - Les oligos peuvent être dilués dans le tampon TE.
  - Le nombre d'amplicons par échantillon doit être compris entre 16 et 384.
    Si la totalité d'une région d'intérêt doit être recouverte de plaques, chaque sonde doit cibler une région comprenant entre 1 et 3 bp identiques à la région adjacente ciblée. Les sondes adjacentes doivent être conçues de sorte à alterner les brins afin d'éviter les interférences.
  - La couverture minimale recommandée par amplicon requise pour un appel de variants est de 75x.

Le nombre d'échantillons par analyse doit être calculé en fonction de la couverture minimale recommandée. Il dépendra de l'uniformité de la couverture du pool d'oligos personnalisé.

Un fichier de manifeste doit être créé pour chaque pool d'oligos personnalisé. Le manifeste est un fichier texte contenant des renseignements sur des régions génomiques ciblées. MiSeq Reporter en a besoin pour réaliser l'analyse. Consultez le site Web d'Illumina pour télécharger un modèle de fichier de manifeste.

Réactifs de pré-amplification

- 10 N NaOH (préparez à partir de comprimés ou utilisez une solution standard)
- Tampon TE
- Eau exempte de DNase et de RNase

Réactifs de post-amplification

- 10 N NaOH (préparez à partir de comprimés ou utilisez une solution standard)

- Éthanol 200 pour la biologie moléculaire
- Tampon TE
- Eau exempte de DNase et de RNase

Stockage et manipulation

1 La température ambiante est définie comme étant entre 15 °C et 30 °C.

2 Les réactifs suivants sont expédiés congelés et sont stables lorsqu'ils sont stockés entre -15 °C et -25 °C jusqu'à la date d'expiration indiquée.
   - Tampon d'hybridation
   - Mélange extension-ligation
   - Primers d'indexage A (A501) - H (A508)
   - Primers d'indexage 1 (A701) - 12 (A712)
   - Polymérase PCR
   - Mélange maître PCR
   - Diluant de normalisation de librairie
   - Tampon de dilution de librairie
   - Contrôle interne PhiX
   - Cartouche de réactifs MiSeqDx

   Excepté pour la cartouche de réactifs, les réactifs sont stables pendant un maximum de six cycles de congélation/décongélation ayant lieu avant la date d'expiration indiquée.

   Il ne faut pas recongeler la cartouche de réactifs après qu'elle ait été décongelée. Elle peut être conservée pendant un maximum de six heures entre 2 °C et 8 °C.

3 Les réactifs suivants sont expédiés réfrigérés et sont stables lorsqu'ils sont stockés entre 2 °C et 8 °C jusqu'à la date d'expiration indiquée.
   - Tampon de lavage strict
   - Tampon de lavage universel
   - Billes de nettoyage PCR
   - Billes de librairie
   - Lavage de normalisation de librairie
   - Solution SBS (PR2) MiSeqDx
   - Flow Cell MiSeqDx

4 Les réactifs suivants sont expédiés à température ambiante et sont stables lorsqu'ils sont stockés à température ambiante jusqu'à la date d'expiration indiquée.
   - Tampon d'élution
   - Plaque filtrante
   - Tampon de stockage de librairie

5 Les changements dans l'apparence physique des réactifs fournis peuvent indiquer une détérioration des matériaux. Si vous constatez des changements dans l'apparence physique des réactifs (p. ex. des changements notables de la couleur ou un voile apparent, signe d'une contamination microbienne), ne les utilisez pas.

6 Les réactifs Tampon d'hybridation, Tampon de lavage strict , et Diluant de normalisation de librairie peuvent former des précipités ou des cristaux visibles. Avant utilisation, agitez vigoureusement à l'aide d'un agitateur vortex, puis inspectez visuellement pour vous assurer qu'il n'y a aucun précipité.

7 Suivez à la lettre les meilleures pratiques suivantes lors de la manipulation de Billes de nettoyage PCR et de Billes de librairie :
   - Les billes ne doivent jamais être congelées.
   - Laissez les billes atteindre la température ambiante.

- Immédiatement avant utilisation, agitez vigoureusement les billes à l'aide d'un agitateur vortex jusqu'à obtenir une suspension adéquate et que la couleur apparaisse homogène.
- Mélangez bien l'échantillon une fois les billes ajoutées en pipettant de haut en bas 10 fois. Un agitateur peut être utilisé pour bien mélanger les échantillons.
- Incubez le mélange bille/échantillon à température ambiante pendant la durée totale indiquée.
- Suivez les instructions lorsque vous utilisez un brin magnétique. Attendez que la solution soit claire avant d'aspirer. Gardez la plaque sur le brin magnétique lorsque vous aspirez doucement le surnageant, en prenant soin de ne pas déranger les billes séparées.

8 La plaque d'amplification par PCR peut rester sur la platine thermique toute la nuit, ou bien elle peut être conservée entre 2 °C et 8 °C pendant un maximum de deux jours. Avant de stocker la plaque entre 2 °C et 8 °C, scellez-la bien.

9 Ne congelez pas les Billes de librairie et ne les mélangez pas au réactif Diluant de normalisation de librairie si ce n'est pas pour une utilisation immédiate.

10 La plaque de normalisation de librairie terminée peut être conservée entre -15 °C et -25 °C pendant un maximum de 3 jours.

11 La librairie d'amplicons regroupés peut être conservée entre -15 °C et -25 °C pendant un maximum de 3 jours.

12 Chargez immédiatement le groupe d'amplicons fraîchement dilués dans la cartouche de réactifs. Le stockage du groupe d'amplicons dilués peut entraîner une réduction considérable de la densité des amplifiats.

Équipement et matériel

Équipement et matériel fournis, vendus séparément

1 **MiSeqDx Instrument**, catalogue nº DX-410-1001

2 **Trousse de montage de plaque d'index TruSeq**, nº de référence FC-130-1005

3 **Trousse de montage de plaque d'index TruSeq & trousse de collier**, nº de référence FC-130-1007

4 **Bouchons de rechange pour l'adaptateur d'index**, nº de référence DX-502-1003

Équipement et matériel nécessaires, non fournis

Équipement et matériel de pré-amplification

1 **Bloc chauffant** : un bloc chauffant pour une plaque à 96 puits est nécessaire. Le bloc chauffant doit être conforme aux spécifications de performance suivantes : Il est possible d'utiliser des blocs chauffants avec des couvercles chauffés.
- Plage de températures : ambiante +5 °C à 99 °C
- Régulation de température : ±0,1 °C à 37 °C; ±0,4 °C à 60 °C

2 **Incubateur d'échantillons** : un incubateur (four à hybridation) est nécessaire. L'incubateur doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
- Plage de températures : 10 °C à 100 °C
- Régulation de température : ±0,2 °C

3 **Centrifugeuse de table** : une centrifugeuse de table capable de maintenir une température de 20 °C est nécessaire. (Une centrifugeuse distincte est nécessaire dans la zone de post-amplification.) N'importe quelle centrifugeuse pour plaques capable d'atteindre les vitesses indiquées par le protocole (280 à 2 400 × g) est acceptable.

4 **Pipettes de précision** : un ensemble de pipettes de précision est nécessaire. (Un ensemble distinct est nécessaire dans la zone de post-amplification.) L'utilisation de pipettes de précision est nécessaire pour s'assurer une distribution précise des réactifs et des échantillons. Les pipettes mono-canal ou multi-canal peuvent être utilisées si elles sont étalonnées régulièrement et sont précises à moins de 5 % du volume indiqué.

5 **Consommables** : les consommables suivants sont nécessaires.
   - Plaques PCR à jupe à 96 puits, 0,2 ml, polypropylène ou équivalent
     REMARQUE : Veillez à ce que la plaque à 96 puits soit compatible avec le support magnétique.
   - Plaques de stockage à 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)
   - Bassin de solution, sans PVC, DNase/RNase (creux)
   - Opercule adhésif en aluminium
   - Joint approprié pour plaques PCR
   - Pointes de pipette résistantes à l'aérosol

Équipement et matériel de post-amplification

1 **Thermocycleur** : un thermocycleur est nécessaire. Le thermocycleur doit avoir un couvercle chauffé et respecter les spécifications de performance suivantes :
   - Plage de contrôle de la température : 4 à 99 °C
   - Précision du contrôle : ±0,25 °C de 35 à 99 °C
2 **Agitateur pour microplaques** : un agitateur pour microplaques est nécessaire dans la zone du laboratoire de post-amplification. L'agitateur pour microplaques doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
   - Vitesse de mélange max. : 3 000 tr/min
   - Plage de vitesses de mélange : 200 à 3 000 tr/min
3 **Centrifugeuse de table** : une centrifugeuse de table capable de maintenir une température de 20 °C est nécessaire. (Une centrifugeuse distincte est nécessaire dans la zone de pré-amplification.) N'importe quelle centrifugeuse pour plaques capable d'atteindre les vitesses indiquées par le protocole (280 à 2 400 × g) est acceptable.
4 **Bloc chauffant** : un bloc chauffant pour les tubes est nécessaire. Le bloc chauffant doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
   - Plage de températures : ambiante +5 °C à 99 °C
   - Régulation de température : ±0,1 °C à 37 °C; ±0,4 °C à 60 °C
5 **Support magnétique** : un support magnétique pour une plaque à 96 puits est nécessaire. De meilleures performances sont observées lorsque les aimants sont situés sur le côté du support et non au bas de ce dernier.
6 **Pipettes de précision** : un ensemble de pipettes de précision est nécessaire. (Un ensemble distinct est nécessaire dans la zone de pré-amplification.) L'utilisation de pipettes de précision est nécessaire pour s'assurer une distribution précise des réactifs et des échantillons. Les pipettes mono-canal ou multi-canal peuvent être utilisées si elles sont étalonnées régulièrement et sont précises à moins de 5 % du volume indiqué.
7 **Consommables** : les consommables suivants sont nécessaires.
   - Plaques PCR à jupe à 96 puits, 0,2 ml, polypropylène ou équivalent
     REMARQUE : Veillez à ce que la plaque à 96 puits soit compatible avec le support magnétique.
   - Plaques de stockage à 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)
   - Tubes coniques, 15 ml
   - Tubes de microcentrifugeuse Eppendorf (bouchon vissé recommandé)
   - Barrettes de huit tubes PCR
   - Bassin de solution, sans PVC, DNase/RNase (creux)
   - Opercule adhésif en aluminium
   - Timbre adhésif pour plaques
   - Pointes de pipette résistantes à l'aérosol

Collecte, transport et stockage des échantillons

REMARQUE :
Manipulez tous les échantillons comme s'il s'agissait d'agents potentiellement infectieux.

1 Les échantillons de sang total recueillis dans des tubes K_2EDTA peuvent être utilisés.
2 Les échantillons de sang total peuvent être stockés pendant un maximum de 7 jours à température ambiante, jusqu'à 30 jours entre 2 et 8 °C, ou jusqu'à 30 jours s'ils sont congelés entre -15 et -25 °C.
3 Transportez le sang total pendant un maximum de 7 jours à température ambiante, 30 jours entre 2 et 8 °C, ou 30 jours si congelé entre -15 et -25 °C. Le transport de sang total doit se conformer aux règlements nationaux, fédéraux, régionaux et locaux sur le transport d'agents étiologiques.
4 Aucun effet négatif sur la performance de la trousse n'a été observé lorsque le sang total a été soumis à six cycles de congélation/décongélation.
5 Aucun effet négatif sur la performance de la trousse n'a été observé sur les échantillons de sang total contenant de la bilirubine, du cholestérol, de l'hémoglobine, des triglycérides ou de l'EDTA.

Avertissements et précautions

ATTENTION
La loi fédérale américaine n'autorise la vente de ce dispositif que sur ordonnance ou par un médecin ou tout autre professionnel de la santé autorisé par la législation de l'état dans lequel il ou elle exerce à utiliser ou ordonner l'utilisation de cet appareil.

1 Certains composants de cette trousse contiennent du formamide, un amide aliphatique constituant probablement une toxine reproductive. (Pour plus de renseignements, consultez la section *Réactifs* à la page 3.) Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et avec les yeux. Mettez au rebut les conteneurs et tout contenu inutilisé conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales applicables. Pour plus de renseignements, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
2 Certains composants de cette trousse contiennent du 2-mercaptoéthanol, un agent réducteur. (Pour plus de renseignements, consultez la section *Réactifs* à la page 3.) Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et avec les yeux. Utilisez ces composants dans une zone bien aérée et mettez au rebut les conteneurs et tout contenu inutilisé conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales applicables. Pour plus de renseignements, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
3 Manipulez tous les échantillons comme s'il s'agissait d'agents potentiellement infectieux.
4 Le non-respect des procédures décrites peut entraîner des résultats erronés ou une baisse considérable de la qualité des échantillons.
5 Utilisez les précautions de laboratoire habituelles. Ne pipettez pas avec la bouche. Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans les zones de travail indiquées. Portez des gants jetables et des blouses de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs de la trousse. Lavez-vous les mains soigneusement après avoir manipulé les échantillons et les réactifs de la trousse.
6 N'utilisez pas un composant de la trousse au-delà de la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du carton de la trousse. N'interchangez pas les composants de la trousse venant de lots de trousse différents. Notez que les numéros de lots de trousse sont indiqués sur l'étiquette du carton de la trousse.
7 Conservez les composants de la trousse à la température spécifiée dans les zones de pré-amplification et post-amplification indiquées.
8 Des cycles de congélation/décongélation répétés (jusqu'à six) des composants de la Boîte 1 ne compromettront pas l'intégrité de la trousse.

9 Pour empêcher la dégradation des échantillons ou réactifs, veillez à ce que toutes les vapeurs d'hypochlorite de sodium se dissipent avant de commencer le protocole.
10 Des pratiques de laboratoire appropriées et une bonne hygiène de laboratoire sont nécessaires pour empêcher les produits PCR de contaminer les réactifs, les instruments et les échantillons d'ADN génomiques. La contamination des PCR peut causer des résultats incorrects et non fiables.
11 Pour éviter la contamination, veillez à ce que les zones de pré-amplification et de post-amplification aient des équipements dédiés (p. ex. pipettes, pointes de pipette, agitateur vortex et centrifugeuse).
12 Évitez la contamination croisée. Utilisez des nouvelles pointes de pipette entre les échantillons et entre les réactifs distribués. Mélangez les échantillons à l'aide d'une pipette et centrifugez la plaque lorsque c'est indiqué. N'agitez pas les plaques avec un agitateur vortex. L'utilisation des pointes résistantes à l'aérosol réduit le risque de rétention d'amplicons et de contamination croisée d'un échantillon à l'autre.
13 Une paire index-échantillon doit correspondre exactement à la feuille d'échantillons. Les inadéquations entre la feuille d'échantillons et le schéma de la plaque entraîneront une perte de l'identification positive des échantillons et un rapport de résultats incorrect.
14 Préparez toujours de l'éthanol frais à 80 % pour les étapes de lavage. L'éthanol peut absorber l'eau présente dans l'air, ce qui affecte les résultats.
15 Veillez à ce que tout l'éthanol soit retiré du bas des puits pendant les étapes de lavage. Des résidus d'éthanol pourraient affecter les résultats.
16 Respectez le temps de séchage indiqué après l'étape du support magnétique pour assurer une évaporation totale. L'éthanol résiduel peut modifier les performances des réactions ultérieures.
17 Ne mélangez pas le pool d'oligos personnalisé et le Tampon d'hybridation avant de les stocker. Lorsqu'il est combiné, le pool d'oligos personnalisé devient instable, même lorsqu'il est conservé congelé.
18 L'utilisation des thermocycleurs à refroidissement actif (p. ex, le refroidissement thermoélectrique, Peltier) n'est pas recommandée pour l'étape d'hybridation. L'étape de refroidissement passif est essentielle pour une hybridation adéquate.
19 Ajoutez toujours le Polymérase PCR au Mélange maître PCR juste avant utilisation. Ne stockez jamais la solution de travail combinée.
20 Durant l'étape de normalisation de la librairie, il est extrêmement important de resuspendre complètement le culot des billes de la librairie. C'est essentiel pour accomplir une densité consistante d'amplifiats sur la lame de la Flow Cell MiSeqDx.
21 Respectez les temps d'incubation indiqués dans l'étape de normalisation de librairie. Une incubation inappropriée peut affecter la représentation de la librairie et la densité des amplifiats.
22 Étant donné le nombre de transferts de plaque et le risque de contamination qui en découle, prenez de grandes précautions pour vous assurer que le contenu du puits reste entièrement dans le puits. N'éclaboussez pas le contenu.
23 La recommandation en matière d'entrée d'ADN de 250 ng permet la variation de quantité d'ADN; la performance de la trousse dépend de ce niveau d'entrée.

Notes procédurales

1 Illumina nécessite qu'un échantillon d'ADN de contrôle positif et un contrôle négatif (NTC ou aucune commande de modèle) soient inclus dans chaque analyse, qui est définie comme une série d'échantillons traités en parallèle. L'échantillon d'ADN de contrôle positif doit être un échantillon bien caractérisé avec une variation connue dans la région d'intérêt.
2 Avant de commencer le protocole du Trousse universelle MiSeqDx 1.0, extrayez et quantifiez l'ADN.
3 Toute méthode d'extraction d'ADN validée peut être utilisée.
4 Quantifiez l'ADN à l'aide d'un spectrophotomètre. Vérifiez que le A260/A280 de l'échantillon d'ADN est > 1,5. Normalisez l'échantillon d'ADN sur 50 ng/µl. Chaque échantillon nécessite 5 µl d'ADN génomique (250 ng au total).

Débit d'échantillons et représentation d'index

Pour la Trousse universelle Illumina MiSeqDx 1.0, le débit d'échantillons par analyse MiSeqDx peut être compris entre 8 et 48 échantillons. Les primers d'indexage utilisés pendant l'amplification par PCR doivent être choisis en fonction du débit d'échantillons final souhaité pour assurer la diversité dans la séquence d'index.

REMARQUE
Pour une efficacité maximale du débit, procédez à la préparation de la librairie pour 96 échantillons au plus, puis répartissez les échantillons en deux analyses de séquençage avec un maximum de 48 échantillons par analyse.

MiSeqDx utilise un voyant DEL vert pour séquencer des bases G/T et un voyant DEL rouge pour séquencer des bases A/C. À chaque cycle, au moins un des deux nucléotides de chaque canal de couleur doit être lu pour assurer un enregistrement approprié. Il est important de maintenir l'équilibrage des couleurs pour chaque base de l'index lu en cours de séquençage, sinon l'échec de l'enregistrement pourrait se produire lors du séquençage de la lecture d'index.

Consultez le Table 9 pour choisir les combinaisons de primers d'indexage pour des analyses avec 48 ou 96 échantillons.

Table 9 Combinaisons de primers d'indexage pour des analyses de séquençage avec 48 ou 96 échantillons

Rangées A à H	Colonnes 1 à 6	Colonnes 7 à 12
Primer d'indexage A (A501)	Primer d'indexage 1 (A701)	Primer d'indexage 6 (A706)
Primer d'indexage B (A502)	Primer d'indexage 2 (A702)	Primer d'indexage 7 (A707)
Primer d'indexage C (A503)	Primer d'indexage 3 (A703)	Primer d'indexage 8 (A708)
Primer d'indexage D (A504)	Primer d'indexage 4 (A704)	Primer d'indexage 9 (A709)
Primer d'indexage E (A505)	Primer d'indexage 5 (A705)	Primer d'indexage 11 (A7011)
Primer d'indexage F (A506)	Primer d'indexage 10 (A710)	Primer d'indexage 12 (A712)
Primer d'indexage G (A507)	--	--
Primer d'indexage H (A508)	--	--

Si le séquençage est inférieur à 48 échantillons dans une analyse de séquençage, sélectionnez les index appropriés sur la base de leurs séquences pour maintenir l'équilibrage des couleurs dans les canaux verts et rouges. Consultez le Table 11 et le Table 12. Au minimum, les analyses comportant 8 à 48 échantillons doivent inclure les combinaisons de Primer d'indexage figurant dans le Table 10.

Pour effectuer avec précision des analyses plus petites, au moins huit échantillons doivent être présents. Si six échantillons uniques (à l'exclusion des contrôles positifs et négatifs) ne sont pas disponibles, il convient d'effectuer l'analyse avec des réplicats d'échantillons de n'importe quel échantillon d'ADN génomique humain. Consultez le Table 10 pour connaître l'ensemble minimal d'index à équilibre chromatique à utiliser pour les analyses de séquençage de huit échantillons.

Table 10 Combinaisons de primers d'indexage pour des analyses de séquençage avec 8 échantillons

	Primer d'indexage 1 (A701)	Primer d'indexage 2 (A702)	Primer d'indexage 10 (A710)
Primer d'indexage C (A503)	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3
Primer d'indexage D (A504)	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6
Primer d'indexage E (A505)	Échantillon 7	Échantillon 8	--

Séquences de primer d'indexage

Table 11 Séquences de Primers d'indexage A (A501) - H (A508)

Primer d'indexage	Séquence
Primer d'indexage A (A501)	TGAACCTT
Primer d'indexage B (A502)	TGCTAAGT
Primer d'indexage C (A503)	TGTTCTCT
Primer d'indexage D (A504)	TAAGACAC
Primer d'indexage E (A505)	CTAATCGA
Primer d'indexage F (A506)	CTAGAACA
Primer d'indexage G (A507)	TAAGTTCC
Primer d'indexage H (A508)	TAGACCTA

Table 12 Séquences de Primers d'indexage 1 (A701) - 12 (A712)

Primer d'indexage	Séquence
Primer d'indexage 1 (A701)	ATCACGAC
Primer d'indexage 2 (A702)	ACAGTGGT
Primer d'indexage 3 (A703)	CAGATCCA
Primer d'indexage 4 (A704)	ACAAACGG
Primer d'indexage 5 (A705)	ACCCAGCA
Primer d'indexage 6 (A706)	AACCCCTC
Primer d'indexage 7 (A707)	CCCAACCT
Primer d'indexage 8 (A708)	CACCACAC
Primer d'indexage 9 (A709)	GAAACCCA
Primer d'indexage 10 (A710)	TGTGACCA
Primer d'indexage 11 (A711)	AGGGTCAA
Primer d'indexage 12 (A712)	AGGAGTGG

Mode d'emploi

Préparation de la feuille d'échantillons MiSeqDx

1. Dans l'écran d'accueil du Gestionnaire de la liste de travail Illumina, sélectionnez **Create Worklist** (Créer une liste de travail).
2. Dans le champ Test Type (Type de test), sélectionnez **MiSeqDx universel**.
3. Dans le champ Worklist Name (Nom de la liste de travail), saisissez un nom pour la feuille d'échantillons.

- Si l'identifiant du code à barres de la cartouche de réactifs alphanumérique est utilisé pour le nom de la feuille d'échantillons, le Logiciel d'exploitation MiSeq (MOS) trouve automatiquement la feuille d'échantillons.
- Si vous utilisez un autre nom pour la feuille d'échantillons, le bouton **Browse** (Parcourir) situé dans le Logiciel d'exploitation MiSeq (MOS) peut être utilisé afin de trouver la feuille d'échantillons appropriée.

4 [Facultatif] Entrez une description pour identifier l'analyse.
5 Assurez-vous que la date correspond à la date de début de l'analyse.
6 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Saisie des renseignements sur les échantillons

1 Dans l'onglet Table (Tableau) ou l'onglet Plate (Plaque), saisissez les renseignements suivants pour chaque puits contenant un échantillon :
   a **Sample ID** (Identifiant de l'échantillon) : saisissez un seul identifiant d'échantillon.
   b **Index 1 et Index 2** : spécifiez l'adaptateur qui sera utilisé pour chaque lecture d'index.
   c **Manifest** (Manifeste) : précise le nom du fichier de manifeste qui contient les renseignements sur les échantillons dans ce puits en particulier.
   Pour plus de renseignements sur le fichier de manifeste, consultez *Pool d'oligos personnalisé* à la page 4.
2 [Facultatif] Pour enregistrer des renseignements plus détaillés sur les échantillons, saisissez un nom et une description.
3 [Facultatif] Pour identifier les contrôles sur la plaque, sélectionnez Negative (Négatif) ou Positive (Positif) dans le menu déroulant **Control** (Contrôle).
4 Accédez à l'onglet Plate Graphic (Graphique de la plaque) et utilisez les options **Copy to Clipboard** (Copier vers le bloc-notes) ou **Print** (Imprimer) pour capturer une image de la plaque d'échantillon.
5 Sélectionnez **Finish** (Terminer).

Hybridation des pools d'oligonucléotides

Préparation

1 Amenez le pool d'oligos personnalisé, le Tampon d'hybridation, les échantillons d'ADN génomique et l'échantillon de contrôle positif à température ambiante.
2 Mélangez vigoureusement le pool d'oligos personnalisé et le Tampon d'hybridation pour s'assurer que tous les précipités ont été complètement dissous, puis centrifugez brièvement les tubes pour recueillir le liquide.
3 Réglez un bloc chauffant de 96 puits à 95 °C.
4 Préchauffez un incubateur à 37 °C.
5 Créez la plaque d'échantillon en fonction du graphique de la plaque imprimé à partir d'IWM.

Procédure

1 Prévoyez une nouvelle plaque PCR de 96 puits (ci-après dénommée la plaque **d'HYBRIDATION**).
2 Ajoutez 5 µl d'échantillon ou de contrôle à 50 ng/µl (250 ng total) dans les puits appropriés dans la plaque **d'HYBRIDATION**. Suivez la disposition de la plaque générée pour une sélection appropriée des puits.
3 Ajoutez 5 µl de pool d'oligos personnalisé à tous les puits contenant l'ADN génomique.
4 Ajoutez 40 µl de Tampon d'hybridation à chaque échantillon dans la plaque **d'HYBRIDATION**. Pipettez doucement vers le haut et le bas 3 à 5 fois pour mélanger.
5 Scellez la plaque **HYB** et centrifugez à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute.
6 Placez la plaque **d'HYBRIDATION** dans le bloc préchauffé à 95 °C et incubez pendant 1 minute.
7 Réduisez le bloc chauffant à 40 °C et continuez à incuber jusqu'à ce que le bloc chauffant atteigne 40 °C (environ 80 minutes).
   Le refroidissement progressif est très important pour une bonne hybridation; par conséquent, les thermocycleurs PCR avec refroidissement actif (p. ex, le refroidissement thermoélectrique, Peltier) ne sont pas recommandés pour ce processus.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ
Après que le bloc chauffant ait atteint 40 °C, la plaque **d'HYBRIDATION** est stable lorsqu'elle est maintenue à 40 °C pendant 2 heures.

Retrait des oligonucléotides non liés

Préparation

1 Ramenez le Mélange extension-ligation, le Tampon de lavage strict et le Tampon de lavage universel à la température ambiante, puis agitez brièvement.
2 Assemblez l'unité d'assemblage de la plaque filtrante (ci-après désignée comme **FPU**) en ordre de haut en bas : couvercle, plaque filtrante, collier d'adaptateur et plaque MIDI.
3 Lavez au préalable la membrane de la plaque filtrante comme suit :
   a Ajoutez 45 µl de Tampon de lavage strict à chaque puits.
   b Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant 5 minutes.

Procédure

1 Retirez la plaque **HYB** du bloc chauffant et centrifugez à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute.
2 Transférez le volume total (d'environ 55 µl) de chaque échantillon aux puits correspondants de la plaque filtrante.
3 Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant 5 minutes.
4 Lavez la plaque filtrante comme suit :
   a Ajoutez 45 µl de Tampon de lavage strict à chaque puits d'échantillon.
   b Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant 5 minutes.
5 Répétez le lavage comme décrit à l'étape précédente.

REMARQUE
Si le tampon de lavage n'est pas complètement évacué, centrifugez encore à 2 400 × g à 20 °C jusqu'à ce que tout le liquide ait disparu (5 à 10 minutes supplémentaires).

6 Jetez tout liquide circulant (contenant du formamide), puis réassemblez la **FPU**.
7 Ajoutez 45 µl de Tampon de lavage universel à chaque puits d'échantillon.
8 Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant 10 minutes.

REMARQUE
Veillez à ce que tout liquide soit vidé après la centrifugation. Répétez la centrifugation si nécessaire.

Extension-ligature des oligonucléotides liés

Procédure

1 Ajoutez 45 µl de Mélange extension-ligation à chaque puits d'échantillon de la plaque filtrante.
2 Scellez la plaque filtrante avec une feuille d'aluminium adhésive, puis posez le couvercle.
3 Incubez le **FPU** dans l'incubateur préchauffé à 37 °C pendant 45 minutes.

Amplification de la PCR

Préparation

1 Préparez une nouvelle solution 0,05 N NaOH
2 Déterminez les primers d'indexage à utiliser selon le graphique de plaque imprimé à partir du Gestionnaire de la liste de travail Illumina.
3 Ramenez Mélange maître PCR et les primers d'indexage appropriées à la température ambiante. Mélangez chaque tube décongelé, puis centrifugez brièvement les tubes.
4 Prévoyez une nouvelle plaque PCR à 96 puits (ci-après dénommée la plaque **AMP**).

5 Ajoutez des primers d'indexage à la plaque AMP comme suit :
   a Ajoutez 4 µl des primers d'indexage sélectionnées [A (A501) – H (A508)] au puits approprié dans une colonne de la plaque **AMP**.
   b Mettez au rebut les bouchons blancs d'origine et utilisez des bouchons blancs neufs.
   c Ajoutez 4 µl des amorces d'index sélectionnées [1 (A701) – 12 (A712)] à la rangée appropriée de la plaque **AMP**. ***Les extrémités doivent être changées après chaque rangée pour éviter la contamination croisée de l'index.***
   d Mettez au rebut les bouchons orange d'origine et utilisez des bouchons orange neufs.
6 Préparez la solution de travail PCR Mélange maître PCR/Polymérase PCR comme suit :
   a Pour 96 échantillons, ajoutez 56 µl de Polymérase PCR à 2,8 ml de Mélange maître PCR.
   b Retournez la solution de travail PCR préparée 20 fois pour la mélanger.

   La solution de travail PCR est stable à température ambiante pendant 10 minutes.

Procédure

1 Retirez le **FPU** de l'incubateur, puis enlevez l'opercule en aluminium.
2 Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant 2 minutes.
3 Ajoutez 25 µl de 0.05 N NaOH à chaque puits d'échantillon sur la plaque filtrante. Pipettez la solution NaOH de haut en bas 5 à 6 fois.
4 Recouvrez et incubez la plaque filtrante à la température ambiante pendant 5 minutes.
5 Pendant que la plaque filtrante est en incubation, transférez 22 µl de la solution de travail PCR à chaque puits de la plaque AMP contenant des amorces d'index.
6 Transférez les échantillons élués du filtre à la plaque AMP comme suit :
   a Pipettez les échantillons de la première colonne de la plaque filtrante de haut en bas 5 à 6 fois.
   b Transférez 20 µl de la plaque filtrante à la colonne correspondante de la plaque **AMP**.
   c Pipettez doucement de haut en bas 5 à 6 fois pour combiner soigneusement l'ADN à la solution de travail PCR.
   d Transférez les autres colonnes de la plaque filtrante à la plaque AMP en procédant de la même manière. ***Les extrémités doivent être changées après chaque colonne pour éviter la contamination croisée de l'index et de l'échantillon.***
7 Scellez la plaque **AMP** et sécurisez avec un rouleau en caoutchouc.
8 Centrifugez à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute.
9 Transférez la plaque AMP vers la zone de post-amplification.
10 Réalisez la PCR en utilisant le programme suivant sur un thermocycleur :
   — 95 °C pendant 3 minutes
   — 25 cycles de :
      — 95 °C pendant 30 secondes
      — 62 °C pendant 30 secondes
      — 72 °C pendant 60 secondes
   — 72 °C pendant 5 minutes
   — Maintenez à 10 °C

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous ne procédez pas immédiatement au nettoyage PCR, la plaque **AMP** peut rester sur le thermocycleur durant la nuit ou être stockée entre 2 et 8 °C, jusqu'à 48 heures.

Nettoyage PCR

Préparation

1 Ramenez les Billes de nettoyage PCR à la température ambiante.
2 Préparez une nouvelle solution d'éthanol à 80 % à partir de l'éthanol absolu.

Procédure

1 Centrifugez la plaque AMP à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute.
2 Mettez en route une nouvelle plaque MIDI (ci-après désigné comme la plaque **CLP**).
3 Renversez les Billes de nettoyage PCR 10 fois. Mélangez vigoureusement à l'aide d'un agitateur vortex, puis renversez 10 fois de plus. Inspectez visuellement la solution pour s'assurer que les billes sont suspendues.
4 Ajoutez 45 µl de Billes de nettoyage PCR dans chaque puits de la plaque **CLP**.
5 Transférez la totalité du produit PCR de la plaque AMP à la plaque **CLP**.
6 Scellez la plaque **CLP** et secouez-la dans un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
7 Incubez à température ambiante sans secouer pendant 10 minutes.
8 Placez la plaque sur un support magnétique pendant au moins 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
9 Avec la plaque **CLP** sur le support magnétique, retirez soigneusement et jetez le surnageant.
10 Avec la plaque **CLP** sur le support magnétique, lavez les billes comme suit :
   a Ajoutez 200 µl d'éthanol à 80 % fraîchement préparé dans chaque puits d'échantillon.
   b Placez la plaque sur le support magnétique pendant 30 secondes ou jusqu'à ce que le surnageant soit éliminé.
   c Retirez le surnageant et mettez-le au rebut.
11 Répétez le lavage comme décrit à l'étape précédente.
12 Utilisez une pipette multi-canal P20 réglée sur 20 µl pour retirer l'excès d'éthanol.
13 Retirez la plaque **CLP** du support magnétique et séchez à l'air libre pendant 10 minutes.
14 Ajoutez 30 µl de Tampon d'élution à chaque échantillon, puis agitez brièvement.
15 Scellez la plaque **CLP** et secouez-la dans un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 2 minutes. Après l'avoir secouée, vérifiez si des échantillons ont été resuspendus. Si non, répétez cette étape.
16 Incubez à température ambiante pendant 2 minutes.
17 Placez la plaque **CLP** sur un support magnétique pendant au moins 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
18 Mettez en route une nouvelle plaque MIDI (ci-après désigné comme la plaque **LNP**).
19 Transférez 20 µl de surnageant de la plaque **CLP** à la plaque **LNP**.
20 [En option] Transférez le 10 µl restant du surnageant de la plaque **CLP** à la nouvelle plaque et étiquetez la plaque avec un nom d'analyse et une date d'analyse. Conservez cette plaque entre -15 et -25 °C jusqu'à la fin de l'analyse de séquençage et de l'analyse de données. Les produits PCR nettoyés peuvent être utilisés pour des efforts de dépannage en cas de pannes d'échantillon.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ
Si vous vous arrêtez à cette étape, scellez la plaque **LNP** et centrifugez-la à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute La plaque est stable pendant une durée maximale de 3 heures entre 2 à 8 °C.

Normalisation de la librairie

Préparation

1 Préparez une nouvelle solution 0.1N NaOH
2 Ramenez Diluant de normalisation de librairie, Billes de librairie et Lavage de normalisation de librairie à la température ambiante.
3 MélangezDiluant de normalisation de librairie vigoureusement et assurez-vous que tous les précipités ont complètement dissous.
4 Mélangez les Billes de librairie vigoureusement pendant une minute avec inversion intermittente jusqu'à ce que les billes soient remises en suspension et qu'aucun culot ne se trouve au fond du tube lorsque celui-ci est inversé.

Procédure

1 Mélangez Diluant de normalisation de librairie et Billes de librairie dans un tube conique de 15 ml tout juste rempli comme suit :

REMARQUE
En cas de traitement de < 24 échantillons, utilisez un nouveau tube de 1,5 ml.

   a Pour 96 échantillons, ajoutez 4,4 ml de Diluant de normalisation de librairie.
   b Pipettez Billes de librairie de haut en bas 10 fois et remettez en suspension.

REMARQUE
Il est extrêmement important de remettre en suspension complètement le culot de billes de la librairie au fond du tube. L'utilisation d'un P1000 permet de s'assurer que les billes sont remises en suspension de manière homogène et qu'il n'y a aucune masse de billes au fond du tube. C'est essentiel pour atteindre la densité régulière des amplifiats sur le Flow Cell.

   c Pour 96 échantillons, pipettez 800 µl de Billes de librairie dans le tube contenant le Diluant de normalisation de librairie.
   d Mélangez en retournant le tube 15 à 20 fois.

2 Ajoutez 45 µl de la solution de travail Diluant de normalisation de librairie/Billes de librairie combinée à chaque puits de la plaque **LNP** contenant des librairies.
3 Scellez la plaque **LNP** et secouez sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 30 minutes.
4 Placez la plaque sur un support magnétique pendant au moins 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
5 La plaque **LNP** sur un support magnétique, retirez avec précaution le surnageant et mettez-le au rebut.
6 Déposez la plaque **LNP** du support magnétique et lavez les billes avec Lavage de normalisation de librairie comme suit :
   a Ajoutez 45 µl de Lavage de normalisation de librairie à chaque puits d'échantillon.
   b Scellez la plaque **LNP** et secouez sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 5 minutes.
   c Placez la plaque sur un support magnétique pendant au moins 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
   d Retirez le surnageant et mettez-le au rebut.
7 Répétez la procédure de Lavage de normalisation de librairie comme décrit à l'étape précédente.
8 Utilisez une pipette multicanaux P20 réglée à 20 µl pour retirer tout excès de Lavage de normalisation de librairie.
9 Déposer la plaque **LNP** du support magnétique et ajoutez 30 µl de la solution 0.1 N NaOH à chaque puits.
10 Scellez la plaque **LNP** et secouez sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 5 minutes.
11 Pendant l'élution de 5 minutes, prévoyez une nouvelle plaque PCR à 96 puits (ci-après dénommée la plaque **SGP**).
12 Ajoutez 30 µl de Tampon de stockage de librairie dans chaque puits à utiliser dans la plaque **SGP**.
13 Après l'élution de 5 minutes, assurez-vous que tous les échantillons dans la plaque **LNP** sont complètement remis en suspension. Si les échantillons ne sont pas complètement remis en suspension, pipettez doucement ces échantillons de haut en bas ou tapotez doucement la plaque sur le banc pour remettre en suspension les billes, puis secouez pendant encore 5 minutes.
14 Placez la plaque **LNP** sur le support magnétique pendant au moins 2 minutes.
15 Transférez le surnageant de la plaque **LNP** à la plaque **SGP**. Pipettez de haut en bas 5 fois pour mélanger.
16 Scellez la plaque **SGP**, puis centrifugez à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ
Si vous ne procédez pas immédiatement au groupement des librairies et au séquençage qui suit sur le MiSeqDx, stockez la plaque **SGP** scellée à une température comprise entre -15 et -25 °C pendant trois jours au maximum.

Groupement des librairies

Préparer le groupage de librairies

1 Réglez un bloc chauffant convenable aux tubes à centrifuger de 1,5 ml sur 96 °C.
2 Dans un seau à glace, préparez un bain d'eau glacée. Réfrigérez le Tampon de dilution de librairie dans le bain d'eau glacée.
3 Commencez par décongeler la cartouche de réactifs de MiSeqDx.

Préparer une nouvelle dilution de NaOH

ATTENTION
L'utilisation de NaOH nouvellement dilué est essentielle pour dénaturer complètement les échantillons pour la génération d'amplifiats sur le MiSeqDx.

1 Combinez les volumes suivants dans un tube de microcentrifugeuse :
   — eau sans DNase et sans RNase (900 µl)
   — NaOH 1,0 N (100 µl) de réserve
2 Retournez le tube plusieurs fois pour mélanger.

Dénaturer et diluer le Contrôle interne PhiX

1 Combinez les volumes suivants pour diluer la librairie Contrôle interne PhiX à 2 nM :
   — Librairie Contrôle interne PhiX de 10 nM (2 µl)
   — tampon 1X TE (8 µl)
2 Combinez les volumes suivants pour obtenir une librairie Contrôle interne PhiX de 1 nM :
   — Librairie Contrôle interne PhiX de 2 nM (10 µl)
   — 0.1 N NaOH (10 µl)
3 Agitez brièvement la solution de la librairie Contrôle interne PhiX de 1 nM.
4 Centrifugez la solution du modèle à 280 × g à 20 °C pendant 1 minute.
5 Incubez à température ambiante durant 4,5 minutes pour dénaturer la librairie Contrôle interne PhiX en brins uniques.
6 Ajoutez le volume suivant de Tampon de dilution de librairie réfrigéré au préalable au tube contenant la librairie Contrôle interne PhiX dénaturé pour obtenir une librairie Contrôle interne PhiX de 20 pM.
   — Librairie Contrôle interne PhiX dénaturée (20 µl)
   — Tampon de dilution de librairie préalablement réfrigéré (980 µl)

Préparer la cartouche de réactifs

1 Décongelez le Cartouche de réactifs MiSeqDx dans un bain d'eau contenant assez d'eau déionisée à température ambiante pour submerger la base de la cartouche de réactifs jusqu'à la ligne de délimitation de l'eau imprimée sur la cartouche de réactifs. Ne pas permettre à l'eau de dépasser la ligne de délimitation de l'eau maximale.
2 Laissez la cartouche de réactifs décongeler dans le bain d'eau à température ambiante pendant environ une heure ou jusqu'à décongélation complète.
3 Retirez la cartouche du bain d'eau et tapotez-la doucement contre la paillasse pour retirer l'eau de la base de la cartouche. Séchez la base de la cartouche. Assurez-vous que l'eau n'a pas éclaboussé la partie supérieure de la cartouche de réactifs.

Inspecter la cartouche de réactifs

1 Retournez la cartouche de réactifs 10 fois pour mélanger les réactifs décongelés, puis vérifiez visuellement que toutes les positions sont décongelées.

REMARQUE :
Il est essentiel que les réactifs contenus dans la cartouche soient parfaitement décongelés et mélangés afin de garantir un séquençage correct.

2 Inspectez visuellement le réactif de l'emplacement 1 pour vérifier qu'il est complètement mélangé et qu'il ne contient pas de précipités.
3 Tapotez doucement la cartouche sur la paillasse pour réduire les bulles d'air dans les réactifs.

REMARQUE
Les tubes des dispositifs d'aspiration MiSeqDx descendant au fond de chaque réservoir pour aspirer les réactifs, il est important qu'aucune bulle d'air ne reste dans les réservoirs.

4 Placez la cartouche de réactifs sur la glace ou réservez-la à une température comprise entre 2 et 8 °C (jusqu'à 6 heures) jusqu'à ce que vous soyez prêt à configurer l'analyse. Pour obtenir de meilleurs résultats, chargez directement l'échantillon et configurez l'analyse.

Préparer les échantillons pour le séquençage

1 Ramenez le Tampon de dilution de librairie à la température ambiante. Agitez le Tampon de dilution de librairie et assurez-vous que tous les précipités sont complètement dissous.
2 Si la plaque **SGP** a été conservée congelée, décongelez la plaque **SGP** à température ambiante.
3 Centrifugez la plaque **SGP** à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute.
4 Mettez en route un tube Eppendorf frais (ci-après désigné comme le tube **PAL**).
5 Déterminez les échantillons à regrouper pour le séquençage. Un maximum de 48 échantillons peut être regroupé pour le séquençage.
6 Si la plaque **SGP** a été conservée congelée, mélangez chaque librairie à séquencer en pipettant de haut en bas 3 à 5 fois.
7 Transférez 5 µl de chaque librairie à séquencer de la plaque **SGP** , colonne par colonne, à une barrette de tubes PCR. Scellez la **SGP** avec un timbre adhésif pour plaque et réservez.

REMARQUE :
Après utilisation, conservez la plaque **SGP** scellée à une température de -15 à -25 °C. La plaque **SGP** scellée est stable pendant un maximum de 3 jours.

8 Combinez et transférez les contenus de la barrette de huit tubes PCR dans le tube **PAL**. Mélangez le tube **PAL** complètement.
9 Mettez en route un tube Eppendorf frais (ci-après désigné comme le tube **DAL**).
10 Ajoutez 585 µl de Tampon de dilution de librairie au tube **DAL**.
11 Ajoutez 6 µl de Contrôle interne PhiX de 20 pM au tube **DAL**. Pipettez de haut en bas 3 à 5 fois pour rincer la pointe et assurer un transfert total.
12 Transférez 9 µl du **PAL** dans le tube **DAL** contenant Tampon de dilution de librairie. Pipettez de haut en bas 3 à 5 fois pour rincer la pointe et assurer un transfert total.
13 Mélangez le tube **DAL** sous agitateur vortex à une vitesse maximale.
14 Centrifugez le tube **DAL** à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute.
15 Incubez le tube **DAL** sur un bloc chauffant à 96 °C pendant 2 minutes.
16 Après l'incubation, inversez le tube **DAL** 1 à 2 fois pour mélanger, puis placez immédiatement dans un bain d'eau glacée.
17 Gardez le tube **DAL** dans un bain d'eau glacée pendant 5 minutes.

Charger les librairies d'échantillons dans la cartouche

1 Utilisez un embout de pipette distinct, propre et vide de 1 ml pour percer l'opercule scellant le réservoir de la cartouche de réactifs portant l'inscription **Load Samples (Charger les échantillons)**.
2 Transférez à l'aide de la pipette 600 µl des librairies d'échantillons dans le réservoir **Load Samples** (Charger les échantillons). Prenez soin d'éviter de toucher l'opercule lors de la distribution de l'échantillon.

Vérifiez qu'il n'y ait pas de bulles d'air dans le réservoir après le chargement de l'échantillon. S'il y a des bulles d'air, tapotez doucement la cartouche sur le banc pour évacuer les bulles.

3 Passez directement à la configuration de l'analyse depuis l'interface du Logiciel d'exploitation MiSeq (MOS).

Configuration de l'analyse

1 Connectez-vous au Logiciel d'exploitation MiSeq (MOS).
2 Sélectionnez **Sequence (Séquencer)**.
Une série d'écrans de configuration de l'analyse s'affichent dans l'ordre suivant : Select Run Type (Sélectionner le type d'analyse), Load Flow Cell (Charger la Flow Cell), Load Reagents (Charger les réactifs), Review (Révision) et Pre-Run Check (Vérification avant analyse).
3 Sélectionnez **Diagnostic Run (Analyse de diagnostic)**.
4 Lorsque l'écran Load Flow Cell (Charger la Flow Cell) s'affiche, nettoyez et chargez la Flow Cell.
5 Fermez le verrou de la Flow Cell et la porte du compartiment de la Flow Cell.
Le verrou et la porte du compartiment doivent être fermés avant le lancement de l'analyse. Une fois la Flow Cell chargée, le logiciel lit et enregistre l'identification par radiofréquence (RFID). Une confirmation de lecture RFID correcte s'affiche dans le coin inférieur droit de l'écran.
6 Lorsque l'écran Load Reagents (Charger les réactifs) s'affiche, videz le flacon à déchets, chargez le flacon de Solution SBS (PR2) MiSeqDx, puis chargez la cartouche de réactifs.
Lorsque le flacon de MiSeqDx SBS Solution (PR2) et la cartouche de réactifs sont chargés, le logiciel lit et enregistre le RFID. Une confirmation de lecture RFID correcte s'affiche dans le coin inférieur droit de l'écran.
7 Sélectionnez la feuille d'échantillons appropriée.
Par défaut, le logiciel recherchera un fichier de feuille d'échantillons avec un nom correspondant au code à barres de la cartouche de réactifs chargée sur l'instrument.
8 Confirmez les paramètres d'analyse et les résultats de la vérification avant analyse.
9 Démarrez l'analyse.
L'écran Sequencing (Séquençage) s'ouvre lorsque l'analyse démarre. Cet écran fournit une représentation visuelle de l'analyse en cours, y compris les intensités et les scores de qualité.

Procédures de contrôle qualité

Les bonnes pratiques de laboratoire exigent qu'un échantillon d'ADN de contrôle positif et un échantillon de contrôle négatif (sans modèle) soient inclus dans chaque analyse. L'échantillon d'ADN de contrôle positif doit être un échantillon bien caractérisé avec des variants connus dans la région d'intérêt.

- Si un contrôle sans modèle génère un débit d'appel > 10 %, alors une contamination dans le contrôle sans modèle s'est produite. Le test est considéré comme un échec et l'ensemble du protocole doit être répété, et ce, à partir de la préparation de la librairie.
- L'échantillon de contrôle positif doit générer le résultat attendu. Si le contrôle positif génère un résultat différent de celui attendu, alors il y a peut-être eu une erreur dans le suivi de l'échantillon ou un enregistrement incorrect des primers d'indexage. L'ensemble du protocole doit être répété, et ce, à partir de la préparation de la librairie.

Caractéristiques de performance

Précision

Deux études distinctes ont été menées pour évaluer la précision de la plateforme MiSeqDx.

Étude 1

Cette étude a utilisé un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 24 434 bases sur 19 chromosomes différents et contenant des exons potentiellement pertinents d'un point de vue clinique. Les 13 échantillons uniques utilisés dans cette étude proviennent de deux parents et 11 enfants qui ont été fréquemment séquencés par plusieurs laboratoires et selon plusieurs méthodes de séquençage. Il y a six échantillons de sujets féminins et sept échantillons de sujets masculins. La précision a été déterminée pour les variants à simple nucléotide (SNV) en comparant les données de l'étude à une base de données de référence bien caractérisée. La séquence de la base de données de référence a été obtenue à partir de la combinaison de plusieurs méthodes de séquençage, de données accessibles au public et de renseignements héréditaires. Le tableau suivant permettant d'évaluer la précision du système a été établi à partir des données de la première analyse au cours de l'étude. Le test n'a pas été répété pour cette étude.

Les résultats de cette étude sont présentés ci-dessous.

Table 13 Données de précision de niveau amplicon de l'étude 1 pour la plateforme MiSeqDx

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
1	1	132	Poly C (5), 63% en GC	13	15	132	0	132	0	100
2	1	128	Poly T (5)	13	15	128	0	128	0	100
3	2	133	-	13	15	133	0	133	0	100
4	2	119	-	13	15	119	0	119	0	100
5	2	127	Poly T (5)	13	15	127	0	127	0	100
6	2	135	Poly A (6)	13	15	135	0	135	0	100
7	2	122	Poly T (5), Poly C (5)	13	15	122	0	122	0	100
8	2	110	Poly T (5)	13	15	110	0	110	0	100
9[8]	2	131	Poly A (14)	13	15	130-131	0	130-131	9	99.54
10	2	117	-	13	15	117	0	117	0	100
11	2	121	-	13	15	121	0	121	0	100
12	2	114	-	13	15	114	0	114	0	100
13	2	129	Poly A (5)	13	15	129	0	129	0	100
14	3	131	Poly A (5), Poly T (5)	13	15	131	0	131	0	100
15	3	130	-	13	15	130	0	130	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
16	3	130	-	13	15	130	0	130	0	100
17	3	117	-	13	15	117	0	117	0	100
18	3	136	Poly T (5)	13	15	136	0	136	0	100
19	3	131	Poly T (5), SNV	13	15	131	0	131	0	100
20	3	123	Poly A (5)	13	15	123	0	123	0	100
21	3	117	Poly A (6), Poly T (5), Région homologue sur un chromosome différent	13	15	117	0	117	0	100
22	3	119	Région homologue sur un chromosome différent	13	15	119	0	119	0	100
23	3	120	-	13	15	120	0	120	0	100
24	3	129	Poly T (5)	13	15	129	0	129	0	100
25	4	133	Poly C (7), 66% en GC	13	15	133	0	133	0	100
26	4	135	Poly C (5), 69% en GC	13	15	135	0	135	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
27	4	123	SNV	13	15	123	0	123	0	100
28	4	134	-	13	15	134	0	134	0	100
29	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100
30	4	121	Poly A (5), SNV	13	15	121	0	121	0	100
31	4	125	-	13	15	125	0	125	0	100
32	4	134	Poly T (5)	13	15	134	0	134	0	100
33	4	118	-	13	15	118	0	118	0	100
34	4	122	Poly A (5)	13	15	122	0	122	0	100
35	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100
36	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
37	4	128	Poly T (6)	13	15	128	0	128	0	100
38	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100
39	4	129	Poly A (5), Poly T (5), SNV	13	15	129	0	129	0	100
40	4	133	Poly T (5), SNV	13	15	133	0	133	0	100
41	4	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
42	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
43	4	135	-	13	15	135	0	135	0	100
44	4	122	-	13	15	122	0	122	0	100
45	4	117	-	13	15	117	0	117	0	100
46[9]	4	124	-	13	15	125	0	125	0	100
47	4	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
48	4	128	Poly A (7)	13	15	128	0	128	0	100
49	4	123	Poly A (6)	13	15	123	0	123	0	100
50	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
51	4	112	-	13	15	112	0	112	0	100
52	4	129	-	13	15	129	0	129	0	100
53	4	126	-	13	15	126	0	126	0	100
54	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100
55	5	131	-	13	15	131	0	131	0	100
56	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100
57	5	120	Poly A (5)	13	15	120	0	120	0	100
58	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
59	5	118	-	13	15	118	0	118	0	100
60	5	112	-	13	15	112	0	112	0	100
61	5	120	-	13	15	120	0	120	0	100
62	5	120	Poly A (5)	13	15	120	0	120	0	100
63	5	115	CT(5)	13	15	115	0	115	0	100
64	5	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
65	5	135	Poly T (6)	13	15	135	0	135	0	100
66	5	131	63% en GC	13	15	131	0	131	0	100
67	5	121	-	13	15	121	0	121	0	100
68	5	132	Poly A (6), Poly T (8)	13	15	132	0	132	0	100
69	7	133	-	13	15	133	0	133	0	100
70	7	120	60% en GC	13	15	120	0	120	0	100
71	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100
72	7	126	Poly A (5), 59% en GC	13	15	126	0	126	0	100
73	7	134	-	13	15	134	0	134	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
74	7	122	Poly C (5), 63% en GC	13	15	122	0	122	0	100
75	7	127	59% en GC; SNV	13	15	127	0	127	0	100
76	7	123	-	13	15	123	0	123	0	100
77	7	125	-	13	15	125	0	125	0	100
78	7	133	Poly A (5), Poly T (5)	13	15	133	0	133	0	100
79	7	116	-	13	15	116	0	116	0	100
80	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100
81	7	118	-	13	15	118	0	118	0	100
82	7	136	67% en GC	13	15	136	0	136	0	100
83	7	131	58% en GC	13	15	131	0	131	0	100
84	7	119	Poly G (6), 61% en GC	13	15	119	0	119	0	100
85	7	122	Poly T (5)	13	15	122	0	122	0	100
86	7	123	Poly A (6)	13	15	123	0	123	0	100
87	8	127	60% en GC	13	15	127	0	127	0	100
88	8	129	57% en GC	13	15	129	0	129	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
89	9	130	Poly T (5)	13	15	130	0	130	0	100
90	9	116	-	13	15	116	0	116	0	100
91	9	119	Région homologue sur un chromosome différent	13	15	119	0	119	0	100
92	9	121	-	13	15	121	0	121	0	100
93	9	117	Région homologue sur un chromosome différent	13	15	117	0	117	0	100
94	9	114	-	13	15	114	0	114	0	100
95[10]	9	129	Poly A (14)	13	15	130	0	129 (sur 130)	15	99.23
96	9	114	Région homologue sur un chromosome différent SNV	13	15	114	0	114	0	100
97	9	122	-	13	15	122	0	122	0	100
98	9	127	Poly A (5), Poly C (5)	13	15	127	0	127	0	100
99	9	133	-	13	15	133	0	133	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
100	9	138	64% en GC	13	15	138	0	138	0	100
101	9	139	-	13	15	139	0	139	0	100
102	9	116	-	13	15	116	0	116	0	100
103	9	133	Poly A (5), 57% en GC	13	15	133	0	133	0	100
104	9	138	57% en GC	13	15	138	0	138	0	100
105	9	136	Poly C (5), 67% en GC	13	15	136	0	136	0	100
106	9	118	70% en GC	13	15	118	0	118	0	100
107	10	128	62% en GC	13	15	128	0	128	0	100
108	10	120	60% en GC	13	15	120	0	120	0	100
109	10	139	58% en GC; SNV	13	15	139	0	139	0	100
110	10	118	57% en GC	13	15	118	0	118	0	100
111	10	123	Poly T (5)	13	15	123	0	123	0	100
112	10	121	-	13	15	121	0	121	0	100
113	10	129	26% en GC	13	15	129	0	129	0	100
114	10	122	-	13	15	122	0	122	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
115	10	124	Poly T (5); Région homologue sur un chromosome différent	13	15	124	0	124	0	100
116	10	135	CA (4)	13	15	135	0	135	0	100
117	10	135	Poly A (6); Région homologue sur un chromosome différent	13	15	135	0	135	0	100
118	10	119	Poly C (5); SNV	13	15	119	0	119	0	100
119	10	125	-	13	15	125	0	125	0	100
120	10	131	-	13	15	131	0	131	0	100
121	10	117	-	13	15	117	0	117	0	100
122	10	116	-	13	15	116	0	116	0	100
123	10	129	58% en GC	13	15	129	0	129	0	100
124	11	117	Poly T (10)	13	15	117	0	117	0	100
125	11	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
126	11	113	Poly A (5)	13	15	113	0	113	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
127	11	129	-	13	15	129	0	129	0	100
128	11	121	Poly T (5)	13	15	121	0	121	0	100
129	11	123	-	13	15	123	0	123	0	100
130	11	127	Poly A (6)	13	15	127	0	127	0	100
131	11	136	Poly T (6)	13	15	136	0	136	0	100
132	11	132	Poly T (5)	13	15	132	0	132	0	100
133	11	115	-	13	15	115	0	115	0	100
134	11	117	Poly T (8); 19% en GC	13	15	117	0	117	0	100
135	11	134	Poly A (5); Poly T (5)	13	15	134	0	134	0	100
136	11	131	Poly A (5)	13	15	131	0	131	0	100
137	11	133	26% en GC; SNV	13	15	133	0	133	0	100
138	11	137	Poly T (8); SNV	13	15	137	0	137	0	100
139	11	131	Poly A (5)	13	15	131	0	131	0	100
140	12	131	-	13	15	131	0	131	0	100
141	12	128	-	13	15	128	0	128	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
142	12	133	Poly A (5)	13	15	133	0	133	0	100
143	12	136	-	13	15	136	0	136	0	100
144	12	124	-	13	15	124	0	124	0	100
145	12	122	59% en GC	13	15	122	0	122	0	100
146	13	122	-	13	15	122	0	122	0	100
147	13	116	Poly C (5)	13	15	116	0	116	0	100
148	13	133	-	13	15	133	0	133	0	100
149	13	117	SNV	13	15	117	0	117	0	100
150	13	124	Poly T (6)	13	15	124	0	124	0	100
151	13	123	Poly T (5); 26% en GC	13	15	123	0	123	0	100
152	13	115	Poly A (5)	13	15	115	0	115	0	100
153	13	125	-	13	15	125	0	125	0	100
154	13	121	-	13	15	121	0	121	0	100
155	13	123	-	13	15	123	0	123	0	100
156	13	114	-	13	15	114	0	114	0	100
157	13	119	-	13	15	119	0	119	0	100
158	14	122	58% en GC	13	15	122	0	122	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
159	16	122	-	13	15	122	0	122	0	100
160	16	121	-	13	15	121	0	121	0	100
161	16	123	Poly C (5)	13	15	123	0	123	0	100
162	17	119	-	13	15	119	0	119	0	100
163	17	119	61% en GC	13	15	119	0	119	0	100
164	17	135	-	13	15	135	0	135	0	100
165	17	116	Poly C (6); 60% en GC; SNV	13	15	116	0	116	0	100
166	17	123	-	13	15	123	0	123	0	100
167	17	116	62% en GC	13	15	116	0	116	0	100
168	17	118	Poly C (5); 65% en GC	13	15	118	0	118	0	100
169	17	129	-	13	15	129	0	129	0	100
170	17	131	Poly G (6); 67% en GC; SNV	13	15	131	0	131	0	100
171	17	127	61% en GC	13	15	127	0	127	0	100
172	17	118	Poly C (5)	13	15	118	0	118	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
173	17	138	61% en GC	13	15	138	0	138	0	100
174	17	131	58% en GC	13	15	131	0	131	0	100
175	18	112	-	13	15	112	0	112	0	100
176	18	124	-	13	15	124	0	124	0	100
177	18	134	Poly A (6)	13	15	134	0	134	0	100
178	18	129	-	13	15	129	0	129	0	100
179	18	133	-	13	15	133	0	133	0	100
180	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100
181	18	114	60% en GC	13	15	114	0	114	0	100
182	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100
183	19	122	Poly G (6); 66% en GC	13	15	122	0	122	0	100
184	19	139	64% en GC	13	15	139	0	139	0	100
185	19	131	67% en GC	13	15	131	0	131	0	100
186	19	141	59% en GC; Région homologue sur un chromosome différent	13	15	141	0	141	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés[2]	Nombre d'appels par échantillon ayant été effectués[3]	Nombre d'aucun-appel[4]	Nombre d'appels corrects par échantillon[5]	Nombre d'appels incorrects [6]	% d'appels corrects [7]
187	19	121	Poly C (5); 72% en GC; Région homologue sur un chromosome différent	13	15	121	0	121	0	100
188	19	138	58% en GC	13	15	138	0	138	0	100
189	19	123	64% en GC	13	15	123	0	123	0	100
190	19	138	-	13	15	138	0	138	0	100
191	20	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
192	22	136	Poly A (7)	13	15	136	0	136	0	100
193	22	122	Poly A (5); Poly C (5)	13	15	122	0	122	0	100
194	22	122	62% en GC; SNV	13	15	122	0	122	0	100
195	22	119	66% en GC	13	15	119	0	119	0	100

[1] S'entend par « fragment analysé » la taille de la région génomique séquencée dans les bases, sans prendre en compte les primers spécifiques à la cible.

[2] Le nombre total d'échantillons répertoriés est de 15, car deux des 13 échantillons uniques analysés ont été analysés en deux réplicats indépendants.

[3] Le nombre d'appels par échantillon ayant été effectués est le nombre de bases ayant une qualité suffisante pour être définis par le système.

[4] Le nombre d'aucun-appels est le nombre de bases dans un amplicon entraînant aucun appel dans l'analyse.

[5] Le nombre d'appels corrects par échantillon est le nombre de bases dans l'amplicon qui ont été définies et ayant des résultats correspondant à la séquence de référence du génome humain version 19 et la référence composite bien caractérisée.

[6] Le nombre d'appels incorrects est le nombre total d'appels incorrects pour le SNV ou l'indel dans cet amplicon; des détails supplémentaires sur les appels incorrects sont présentés dans les notes de bas de page ci-dessous.

[7] Le % d'appels corrects correspond au taux d'appels corrects pour toutes les bases dans l'amplicon, où l'appel correct pour le SNV ou l'indel est basé sur les renseignements de référence composite bien caractérisée et l'appel correct pour les bases dans le reste de la séquence de l'amplicon est basé sur la comparaison de la séquence de référence du génome humain version 19. Cette colonne peut afficher plus d'un résultat prévu pour un amplicon donné si certains échantillons contiennent un indel et d'autres non, par exemple, l'amplicon 9. Le % d'appels corrects pour les échantillons avec un résultat incorrect est présenté dans le tableau.

[8] L'amplicon 9 a une analyse d'homopolymères de 14 A selon la séquence de référence du génome humain version 19. Toutefois, les renseignements de référence composite bien caractérisée pour sept des 13 échantillons ont 13 A dans cette analyse d'homopolymères. Dans ces sept échantillons, cette suppression de paires de base 1 représente un faux négatif dans l'étude de précision de séquençage MiSeqDx.

[9] L'amplicon 46 a une insertion de base 1 qui est rapportée dans neuf échantillons dans la base de données de référence bien caractérisée et est correctement détectée dans tous les échantillons analysés.

[10] L'amplicon 95 a une analyse d'homopolymères de 14 A selon la séquence de référence du génome humain version 19. Cependant, les séquences de référence composite bien caractérisée pour 13 des 13 échantillons ont 15 A dans cette analyse d'homopolymères. Dans ces 13 échantillons, cette insertion de paires de base 1 représente un faux négatif dans l'étude de précision de séquençage MiSeqDx.

Le tableau suivant contient les données de l'Étude 1 présentées avec la concordance positive et négative en pour cent, où les résultats des variants sont comparés aux renseignements de référence composite bien caractérisée pour le calcul de la concordance positive en pour cent (CPP). Étant donné que les renseignements de référence composite fournissent uniquement des résultats pour les variants à simple nucléotide et les insertions/suppressions, les résultats des bases sans variants sont comparés à la séquence de référence du génome humain version 19 pour le calcul de la concordance négative en pour cent (CNP). Toutes les bases sans variants avaient un taux de concordance de 100 % avec la séquence de référence. Tous les SNV avaient un taux de concordance de 100 % avec la séquence de référence. Les variants qui ont été manqués étaient des insertions de base 1 ou des suppressions de base 1 dans les régions d'homopolymères.

Table 14 Concordance des résultats des appels de bases de la plateforme MiSeqDx avec les données de référence pour 13 échantillons bien caractérisés

Échantillon	Nb. d'amplicons	% de couverture d'amplicons[1]	Variants attendus par échantillon[2]	Variants correctement appelés	Variants manqués[3]	Bases sans variants appelées correctement	CPP[4](%)	CNP[5] (%)
NA12877	195	100	19	17	2	24418	89.47	100
NA12878	195	100	19	17	2	24417	89.47	100
NA12879	195	100	20	19	1	24416	95.00	100
NA12880	195	100	20	18	2	24417	90.00	100
NA12881	195	100	22	20	2	24415	90.91	100
NA12882	195	100	16	15	1	24419	93.75	100
NA12883	195	100	24	23	1	24412	95.83	100
NA12884	195	100	21	20	1	24415	95.24	100
NA12885	195	100	19	17	2	24417	89.47	100
NA12886	195	100	22	20	2	24415	90.91	100
NA12887	195	100	19	18	1	24416	94.74	100
NA12888	195	100	24	23	1	24412	95.83	100
NA12893	195	100	20	18	2	24417	90.00	100

[1] Le % de couverture d'amplicons est le nombre de bases dans les amplicons séquencées avec fiabilité.
[2] Les variants prévus par échantillon comprennent les SNV et les indels.
[3] Pour les variants manqués, veuillez consulter le premier tableau de l'étude 1 et les notes de bas de page 8 à 10.

[4] Concordance positive en pour cent (CPP) = 100 × TP/(TP + FN), où les vrais positifs (TP) sont le nombre d'appels de variants positifs aux coordonnées génomiques où sont présents les variants selon la séquence de référence et l'allèle mutant appelé est concordant avec la séquence de référence (colonne nommée « Variants appelés correctement ») et les faux négatifs (FN) sont le nombre d'appels de variants négatifs aux coordonnées génomiques où sont présents les variants selon la séquence de référence (colonne nommée « Variants manqués »).

[5] Concordance négative en pour cent (CNP) = 100 × TN/(FP + TN) où les faux positifs (FP) sont le nombre d'appels de variants positifs aux coordonnées génomiques où sont absents les variants selon la séquence de référence, ou si l'allèle mutant appelé est discordant avec la séquence de référence (non référencé dans le tableau; aucun appel de variants faux positifs n'a été effectué dans cette étude) et les vrais négatifs (TN) sont le nombre d'appels de variants négatifs aux coordonnées génomiques où sont absents les variants selon la séquence de référence (colonne nommée « Bases sans variants appelées correctement »).

Étude 2

Les résultats de séquençage pour le panel d'amplicons ci-dessus ont été comparés à un génotype d'une grande fiabilité établi pour NA12878 par le National Institutes of Standards and Technology (NIST, Institut national des normes et de la technologie) (v.2.15[1]). Sur les 195 amplicons, 184 amplicons étaient compris dans les appels de référence d'une grande fiabilité dans la séquence du NIST et ont été comparés. Les appels des bases sans variants ont été comparés à la séquence du génome humain de référence version 19.

Table 15 Comparaison des résultats de séquençage de la plateforme MiSeqDx pour l'échantillon NA12878 dans la base de données du NIST

Échantillon	Nb. d'amplicons	% de couverture d'amplicons[2]	Variants attendus	Variants correctement appelés	Variants manqués	Bases sans variants appelées correctement	CPP[3] (%)	CNP[4] (%)
NA12878	184	100	17	16	1[5]	23066	94.12	100

[1] Zook, JM et al. Integrating sequencing datasets to form highly confident SNP and indel genotype calls for a whole human genome.
[2] Le % de couverture d'amplicons est le nombre de bases dans les amplicons séquencées avec fiabilité.
[3] Concordance positive en pour cent (CPP) = 100 × TP/(TP + FN).
[4] Concordance négative en pour cent (CNP) = 100 × TN/(FP + TN).
[5] Le variant manqué est la suppression de paires de base 1 dans l'amplicon 9 d'une analyse d'homopolymères de 14 A non appelée par le MiSeqDx présent dans la séquence NIST. Notez que la séquence du NIST n'inclut pas l'insertion de paires de base 1 dans l'autre homopolymère de A qui était présent dans l'autre base de données de référence utilisée ci-dessus dans l'étude 1.

Les données qui ressortent de ces études de précision confirment que la plateforme MiSeqDx peut séquencer avec précision les éléments suivants.

- Teneur en GC ≥ 19 % (toutes les bases dans 135 des 135 amplicons séquencés ayant un taux de 19 % de teneur en GC appelé correctement)
- Teneur en GC ≤ 72 % (toutes les bases dans 135 des 135 amplicons séquencés ayant un taux de 72 % de teneur en GC appelé correctement)
- Longueurs de PolyA ≤ 7 (la répétition PolyA de 7 nucléotides a été appelée correctement dans 270 des 270 amplicons séquencés contenant PolyA = 7)
- Longueurs de PolyT ≤ 8 (la répétition PolyT de 8 nucléotides a été appelée correctement dans 270 des 270 amplicons séquencés contenant PolyT = 8)
- Longueurs de PolyG ≤ 6 (la répétition PolyG de 6 nucléotides a été appelée correctement dans 405 des 405 amplicons séquencés contenant PolyG = 6)
- Longueurs de PolyC ≤ 7 (la répétition PolyC de 7 nucléotides a été appelée correctement dans 135 des 135 amplicons séquencés contenant PolyC = 7)

- Longueurs de répétition de dinucléotide ≤ 5 × (toutes les bases dans 135 des 135 amplicons séquencés avec 5 × répétition de dinucléotide ont été appelées correctement)
- Longueurs de répétition de trinucléotide ≤ 4 × (toutes les bases dans 810 des 810 amplicons séquencés avec 4 × répétition de trinucléotide ont été appelées correctement)
- Insertions de base 1 et suppression de 3 bases ou moins
  - 2 des 3 insertions de base testées ont été appelées correctement. Des appels corrects ont été effectués pour deux insertions de base 1 dans des régions non homopolymères dans 82 amplicons. Une insertion de base 1 n'a pas été appelée dans une analyse d'homopolymères de 14 A sur le chromosome 2 dans 135 amplicons.
  - 3 suppressions de base 1 sur 4 ont été appelées correctement. Tous les appels corrects ont été effectués dans des régions non homopolymères dans 4 amplicons. Une suppression de base 1 n'a pas été appelée dans une analyse d'homopolymères de 14 A sur le chromosome 9 dans 63 amplicons.
  - Les suppressions de base 2 ont été appelées correctement dans un échantillon.
  - Les suppressions de base 3 ont été appelées correctement dans 21 échantillons.

Reproductibilité

La reproductibilité de la plateforme MiSeqDx a été déterminée à l'aide de deux tests représentatifs.

Étude 1

Un test représentatif a été conçu pour étudier divers gènes couvrant 24 434 bases sur 19 chromosomes différents et contenant des exons potentiellement cliniquement pertinents. L'étude a examiné 13 échantillons sur neuf analyses à l'aide de trois différents instruments MiSeqDx et trois opérateurs différents (Table 16). Un seul lot de réactifs de préparation de librairie et deux lots de consommables pour le séquençage ont été utilisés. Les 13 échantillons provenaient de deux parents et 11 enfants qui avaient été fréquemment séquencés par plusieurs laboratoires et selon plusieurs méthodes de séquençage. Deux échantillons ont été analysés en double exemplaire, donc chaque analyse a généré des résultats pour 15 échantillons.

Pour l'évaluation de la reproductibilité de lot à lot, 94 échantillons et deux contrôles sans modèle ont été testés dans l'ensemble de trois lots. Chaque lot a été scindé en deux analyses de 48 échantillons pour tester tous les réactifs et les combinaisons de primers d'indexage possibles. Toutes les analyses de séquençage ont été effectuées par un seul opérateur et sur un seul instrument MiSeqDx pour éliminer tout écart éventuel d'opérateur ou instrument (Table 17).

Des appels corrects ont été déterminés pour des variants de nucléotides uniques (SNV) en comparant les données de l'étude à des renseignements de référence bien caractérisée. Il n'y a eu aucun échec d'analyse ou répétition d'analyse pour l'étude de reproductibilité. Les tableaux suivants montrent les résultats des études pour évaluer la reproductibilité du système.

Table 16 Résultats de la reproductibilité d'instrument-à-instrument de l'étude 1 pour la plateforme MiSeqDx (au niveau de l'amplicon)

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé [1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
1	1	132	Poly C (5); 63% en GC	135	0	0	100	23[6]	0	99.61[7]	39[6]	0	99.34[7]
2	1	128	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	2	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	2	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
5	2	127	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
6	2	135	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
7	2	122	Poly T (5); Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
8	2	110	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
9	2	131	Poly A (14)	135	0	27[8]	99.54	0	27[8]	99.54	0	27[8]	99.54
10	2	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
11	2	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
12	2	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
13	2	129	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
14	3	131	Poly A (5); Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
15	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
16	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
17	3	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
18	3	136	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
19	3	131	Poly T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
20	3	123	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
21	3	117	Poly A (6); Poly T (5); Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
22	3	119	Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
23	3	120	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
24	3	129	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
25	4	133	Poly C (7); 66% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
26	4	135	Poly C (5); 69% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
27	4	123	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
28	4	134	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
29	4	132	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
30	4	121	Poly A (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
31	4	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
32	4	134	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
33	4	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
34	4	122	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
35	4	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
36	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
37	4	128	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
38	4	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
39	4	129	Poly A (5); Poly T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
40	4	133	Poly T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
41	4	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
42	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
43	4	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
44	4	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
45	4	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
46	4	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
47	4	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
48	4	128	Poly A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
49	4	123	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
50	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
51	4	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
52	4	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
53	4	126	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
54	4	132	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
55	5	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
56	5	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
57	5	120	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
58	5	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
59	5	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
60	5	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
61	5	120	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
62	5	120	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
63	5	115	CT(5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
64	5	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
65	5	135	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
66	5	131	63% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
67	5	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
68	5	132	Poly A (6); Poly T (8)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
69	7	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
70	7	120	60% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
71	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
72	7	126	Poly A (5); 59% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
73	7	134	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
74	7	122	Poly C (5); 63% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
75	7	127	59% en GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
76	7	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
77	7	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
78	7	133	Poly A (5); Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
79	7	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
80	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
81	7	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
82	7	136	67% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
83	7	131	58% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
84	7	119	Poly G (6); 61% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
85	7	122	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
86	7	123	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
87	8	127	60% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
88	8	129	57% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
89	9	130	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
90	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
91	9	119	Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
92	9	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
93	9	117	Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
94	9	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
95	9	129	Poly A (14)	135	0	45[9]	99.22	0	45[9]	99.22	0	45[9]	99.22
96	9	114	Région homologue sur un chromosome différent; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
97	9	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
98	9	127	Poly A (5); Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
99	9	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
100	9	138	64% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
101	9	139	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
102	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
103	9	133	Poly A (5); 57% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
104	9	138	57% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
105	9	136	Poly C (5); 67% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
106	9	118	70% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
107	10	128	62% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
108	10	120	60% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
109	10	139	58% en GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
110	10	118	57% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
111	10	123	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
112	10	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
113	10	129	26% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
114	10	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
115	10	124	Poly T (5); Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
116	10	135	CA (4)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
117	10	135	Poly A (6); Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
118	10	119	Poly C (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
119	10	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
120	10	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
121	10	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
122	10	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
123	10	129	58% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
124	11	117	Poly T (10)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
125	11	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
126	11	113	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
127	11	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
128	11	121	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
129	11	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
130	11	127	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
131	11	136	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
132	11	132	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
133	11	115	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
134	11	117	Poly T (8); 19% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
135	11	134	Poly A (5); Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
136	11	131	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
137	11	133	SNV; 26% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
138	11	137	Poly T (8); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
139	11	131	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
140	12	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
141	12	128	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
142	12	133	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
143	12	136	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
144	12	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
145	12	122	59% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
146	13	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
147	13	116	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
148	13	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
149	13	117	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
150	13	124	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
151	13	123	Poly T (5); 26% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
152	13	115	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
153	13	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
154	13	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
155	13	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
156	13	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
157	13	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
158	14	122	58% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
159	16	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
160	16	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
161	16	123	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
162	17	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
163	17	119	61% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
164	17	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
165	17	116	Poly C (6); 60% en GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
166	17	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
167	17	116	62% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
168	17	118	Poly C (5); 65% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
169	17	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
170	17	131	Poly G (6); 67% en GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
171	17	127	61% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
172	17	118	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
173	17	138	61% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé[1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
174	17	131	58% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
175	18	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
176	18	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
177	18	134	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
178	18	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
179	18	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
180	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
181	18	114	60% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
182	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
183	19	122	Poly G (6); 66% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
184	19	139	64% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
185	19	131	67% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
186	19	141	59% en GC; Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé [1]	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]	Nombre total d'aucun-appels[3]	Nombre total d'appels incorrects[4]	% d'appels corrects[5]
187	19	121	Poly C (5); 72% en GC; Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
188	19	138	58% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
189	19	123	64% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
190	19	138	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
191	20	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
192	22	136	Poly A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
193	22	122	Poly A (5); Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
194	22	122	62% en GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
195	22	119	66% en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

[1] S'entend par « fragment analysé » la taille de la région génomique séquencée dans les bases, sans prendre en compte les primers spécifiques à la cible.
[2] Le nombre d'échantillons est calculé à partir de 9 analyses de 15 échantillons (11 échantillons analysés une fois et 2 échantillons analysés deux fois).
[3] Le nombre total d'aucun-appels est le nombre total d'aucun-appels obtenu pour l'ensemble des 45 analyses analysant l'amplicon spécifique à l'aide d'un instrument MiSeqDx spécifié.
[4] Le nombre total d'appels incorrects est le nombre total d'appels incorrects obtenus pour l'ensemble des 45 analyses analysant l'amplicon spécifique à l'aide d'un instrument MiSeqDx spécifié.

[5] Le % d'appels corrects correspond au taux d'appels corrects pour toutes les bases dans l'amplicon, où l'appel correct pour le SNV ou l'indel est basé sur la base de données de référence bien caractérisée et l'appel correct pour les bases dans le reste de la séquence d'amplicon est basé sur la comparaison de la séquence de référence du génome humain version 19. Cette colonne peut afficher plus d'un résultat prévu pour un amplicon donné si certains échantillons doivent avoir un indel et d'autres non, par exemple, l'amplicon 9.

[6] L'amplicon 1 possédait un certain nombre de bases dont le génotype ne pouvait pas être appelé : 12 bases dans une analyse sur neuf dans NA12881; une base dans deux analyses sur neuf et trois bases dans une analyse sur neuf dans NA12886; 20 bases dans une analyse sur neuf et 26 bases dans une analyse sur neuf dans NA12888. Cela est dû à la faible couverture dans les bases sans aucun appel dans ces analyses, où la profondeur moyenne de séquençage était de 33,2, avec un minimum de 21 et un maximum de 52.

[7] Lorsque le nombre d'aucun-appels n'est pas inclus dans le calcul, le taux d'appels corrects est de 100 %.

[8] L'amplicon 9 a une analyse d'homopolymères de 14 A selon la séquence de référence du génome humain version 19. Cependant, les renseignements de référence bien caractérisée pour 7 des 13 échantillons ont 13 A dans cette analyse d'homopolymères. Dans ces 7 échantillons, cette suppression de paires de base 1 s'appelle un faux négatif et est appelée comme faux négatif de façon reproductible dans les neuf analyses.

[9] L'amplicon 95 a une analyse d'homopolymères de 14 A selon la séquence de référence du génome humain version 19. Cependant, les séquences de renseignements de référence bien caractérisée pour 13 des 13 échantillons ont 15 A dans cette analyse d'homopolymères. Dans ces 13 échantillons, cette insertion de paires de base 1 n'est pas appelée de façon reproductible à 100 % (c.-à-d. qu'il s'agit d'un faux négatif).

Les résultats de l'étude 1 de reproductibilité pour chaque échantillon sont présentés composés à partir des neuf analyses dans une seule colonne. Les résultats affichés sont exclusivement ceux des variants à simple nucléotide et les résultats des insertions/suppressions par rapport à la séquence de base de données de référence pour trois analyses sur trois instruments. Cette analyse a démontré que les résultats pour les variants étaient reproductibles sur neuf analyses pour ces échantillons.

Table 17 Résumé des résultats de reproductibilité de la plateforme MiSeqDx pour 13 échantillons bien caractérisés

Nº d'ADN	Identifiant de l'échantillon d'ADN	Nombre d'analyses par échantillon	Nombre de SNV	Variants à simple nucléotide (SNV)			Nombre d'indels	Insertions\suppressions (indels)		
				Nombre de bases appelées correctement	Nombre de faux positifs[1]	Nombre de faux négatifs[2]		Nombre de bases appelées correctement	Nombre de faux positifs[1]	Nombre de faux négatifs[2]
1	NA12877[3]	18	16	16	0	0	3	1	0	2
2	NA12878[3]	18	17	17	0	0	2	0	0	2
3	NA12879	9	18	18	0	0	2	1	0	1
4	NA12880	9	17	17	0	0	3	1	0	2
5	NA12881	9	19	19	0	0	3	1	0	2
6	NA12882	9	15	15	0	0	1	0	0	1
7	NA12883	9	22	22	0	0	2	1	0	1
8	NA12884	9	19	19	0	0	2	1	0	1
9	NA12885	9	17	17	0	0	2	0	0	2
10	NA12886	9	19	19	0	0	3	1	0	2
11	NA12887	9	18	18	0	0	1	0	0	1
12	NA12888	9	22	22	0	0	2	1	0	1
13	NA12893	9	17	17	0	0	3	1	0	2

[1] Faux positif = variant appelé par l'analyse de séquençage MiSeqDx mais non répertorié dans la base de données de référence.
[2] Faux négatif = variant dans la base de données de référence, mais non appelé dans l'analyse de séquençage MiSeqDx.
[3] Les échantillons NA12877 et NA12878 ont été analysés en double exemplaire. Les échantillons répliqués ont généré des résultats identiques.

Étude 2

Une étude de reproductibilité de site à site a été effectuée avec un test représentatif, le test de la fibrose kystique à 139 variants Illumina MiSeqDx, incluant un sous-ensemble de variations du gène *CFTR* pertinentes d'un point de vue clinique analysées avec le logiciel MiSeq Reporter à l'aide de la plateforme de flux de travail de séquençage d'ADN ciblé MiSeqDx. L'étude en aveugle a été réalisée sur trois sites d'essais et a nécessité deux opérateurs sur chaque site. Deux panels bien caractérisés de 46 échantillons chacun ont été analysés par chacun des opérateurs sur chaque site pour un total de 810 appels par site. Les panels contenaient un mélange d'ADN génomique issu des lignées cellulaires ayant des variants connus dans le gène *CFTR*, ainsi que du sang déleucocyté enrichi de lignées cellulaires ayant des variants connus dans le gène *CFTR*. Les échantillons de sang ont été fournis pour permettre l'incorporation des étapes d'extraction utilisées dans la préparation d'ADN génomique servant d'entrée primaire pour le flux de travail du test. Le débit de passage des échantillons, défini comme le nombre d'échantillons passant les métriques de CQ lors de la première tentative, était de 99,9 %. Tous les résultats des tests sont basés sur un test initial.

Table 18 Résumé des résultats de l'étude de reproductibilité réalisée avec un test représentatif de la fibrose kystique à 139 variants MiSeqDx.

Panel	N° d'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nombre d'appels incorrects	Nombre d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G > A		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4[1]	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1[1]	100	100	100
A	5[2]	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135[2]	94.44	94.44	94.44
A	6	F508del/2183AA > G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	N° d'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nombre d'appels incorrects	Nombre d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9[3]	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2[3]	0	97.22	99.96	99.92
A	10[3]	F508del/3272-26A > G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2[3]	0	97.22	99.96	99.92
A	11	F508del/3849 + 10kbC > T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621 + 1G > T/3120 + 1G > A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C absents	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100

Panel	N° d'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nombre d'appels incorrects	Nombre d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621 + 1 G > T / 711 + 1G > T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621 + 1G > T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C > A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	N° d'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nombre d'appels incorrects	Nombre d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	28	3849 + 10kbC > T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G > A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
A	39	F508del/3849 + 10kbC > T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621 + 1G > T/3120 + 1G > A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	N° d'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nombre d'appels incorrects	Nombre d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621 + 1G > T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789 + 5G > A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898 + 1G > A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100

Panel	N° d'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nombre d'appels incorrects	Nombre d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	N° d'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nombre d'appels incorrects	Nombre d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
B	67	S549R (c.1647T > G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72[4]	621 + 1G > T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1[4]	100	99.96	99.96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75[2]	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135[2]	94.44	94.44	94.44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621 + 1G > T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G > A		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	N° d'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nombre d'appels incorrects	Nombre d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG) 10(T) 9/(TG) 12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789 + 5G > A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86[4]	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1[4]	100	99.96	99.96
B	87	F508del/1898 + 1G > A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Total				74556	2209			221182			4	273	99.77	99.88	99.88

[1] L'emplacement de type sauvage, correspondant au variant N1303K pour un réplicat, n'a entraîné aucun appel à cause d'une couverture insuffisante.
[2] Un réplicat des échantillons 5 et 75 avait un débit d'appel de 0 %. Le complément d'enquête indique que des échantillons peuvent ne pas avoir été ajoutés à la plaque d'échantillons avant la préparation de la librairie, car les volumes d'échantillon restants dans les tubes ne correspondaient à aucun volume ayant été supprimé.
[3] Des preuves indiquent que les échantillons 9 et 10 ont été vraisemblablement échangés par l'opérateur avant la préparation de la librairie.
[4] L'emplacement de type sauvage, correspondant au variant M1V pour un réplicat de chacun des deux échantillons n'a entraîné aucun appel à cause d'une couverture insuffisante.

Extraction d'ADN

Trois différentes méthodes d'extraction, à savoir l'extraction à base de billes magnétiques, la précipitation dans l'alcool et la filtration sur colonne de silice, ont été évaluées à l'aide de sang total K_2EDTA anticoagulé. Quatorze échantillons de sang unique ont été utilisés dans l'étude, représentant une plage de génotypes d'un seul gène représentatif. Les trois méthodes d'extraction de l'ADN ont été testées indépendamment par 2 opérateurs différents qui ont chacun effectué 3 analyses par la méthode d'extraction. Chaque extraction a été réalisée par chaque opérateur à des jours différents. La concentration d'ADN et le rapport A260/A280 des échantillons d'ADN génomique extrait ont été déterminés par spectrophotométrie. La taille totale des échantillons pour chaque méthode d'extraction dans cette étude était de 168 (14 échantillons × 2 opérateurs/méthode d'extraction × 3 analyses/opérateur × 2 réplicats/échantillon d'ADN génomique extrait).

Méthode d'extraction	Nombre d'échantillons testés	Débit d'appel	Précision[1]	Débit au premier passage de l'échantillon[2]
Précipitation dans l'alcool	168	100%	100%	100%
Filtration sur colonne de silice	168	100%	100%	100%
Extraction à base de billes magnétiques	168	100%	100%	100%

[1]Précision : la concordance en pour cent avec une méthode d'essai de référence (séquençage bidirectionnel de Sanger) calculée pour les positions de base qui reçoivent un appel de base.

[2] Débit au premier passage de l'échantillon : le nombre d'échantillons respectant le taux d'appel spécifié la première fois qu'ils sont traités (c'est-à-dire, sans qu'il soit nécessaire de procéder à une nouvelle analyse ou un traitement supplémentaire) en pourcentage du nombre total d'analyses d'échantillons au cours d'une seule expérience de séquençage MiSeqDx.

Entrée d'ADN

La plage d'entrée d'ADN pour la plateforme MiSeqDx a été évaluée en effectuant une étude de dilution en série à l'aide de 14 échantillons d'ADN représentatifs contenant 16 variants du gène unique. Chaque échantillon a été testé en double exemplaire à 9 niveaux d'entrée d'ADN allant de 1 250 ng à 1 ng (1 250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng et 1 ng). Pour la détermination de la précision, des génotypes de l'échantillon ont été comparés aux données de séquençage bidirectionnel par la méthode de Sanger. La limite supérieure de l'entrée d'ADN a été déterminé à 1 250 ng et la limite inférieure à 25 ng, car celles-ci présentaient un débit au premier passage de l'échantillon ≥ 95 % sans aucun appel incorrect (taux de 100 % de précision et d'appel).

Les entrées d'ADN de 1 250 ng, 250 ng et 100 ng ont fait l'objet d'autres tests avec 4 échantillons d'ADN représentatifs et 20 réplicats par niveau d'entrée d'ADN pour chaque échantillon (n = 4 * 20 = 80 échantillons), tandis que la limite inférieure de 25 ng a été testée avec 14 échantillons, 20 réplicats pour chaque échantillon (n = 14 * 20 = 280 échantillons). Le débit au premier passage de l'échantillon et le taux de précision était de 100 % à tous les niveaux d'entrée d'ADN et les taux d'appel de l'échantillon étaient > 99 %.

Substances interférentes

Pour évaluer l'impact des substances interférentes sur la plateforme MiSeqDx, un test représentatif conçu pour étudier un seul gène couvrant 11 529 bases a été évalué en présence et en absence d'interférences potentielles. Huit échantillons de sang total représentant huit génotypes uniques ont été utilisés dans l'étude. Quatre substances interférentes endogènes (bilirubine, cholestérol, hémoglobine et triglycérides) ont été testées en les intégrant dans les échantillons de sang total avant l'extraction d'ADN. Pour évaluer l'interférence résultant du prélèvement sanguin (petit volume), de l'EDTA a été intégré dans des échantillons de sang à deux concentrations. Les limites de concentration pour chaque

substance sont indiquées dans le tableau ci-dessous. En outre, afin d'évaluer les interférences résultant de la préparation des échantillons, on a ajouté 15 % de tampon de lavage à 8 ADN génomiques purifiés. Un débit d'appel de 100 % a été atteint pour tous les échantillons testés en plus des 100 % de reproductibilité dans les typages génotypes entre les échantillons en présence et en l'absence de substances interférentes.

Substance de test	Nombre total de réplicats	Concentration analysée dans le sang (limite supérieure)	Concentration analysée dans le sang (limite inférieure)	Débit d'appel
Bilirubine	16	684 µmol/L	137 µmol/L	100%
Cholestérol	16	13 mmol/L	2.6 mmol/L	100%
Hémoglobine	16	2 g/l	0.4 g/l	100%
Triglycéride	16	37 mmol/L	7.4 mmol/L	100%
EDTA	16	7 mg/mL	2,8 mg/mL	100%

Indexage de l'échantillon

Des primers d'indexage de l'échantillon sont utilisés dans la trousse pour attribuer un code à barres unique à chaque échantillon d'ADN, permettant de grouper plusieurs échantillons en une seule analyse de séquençage.

Un total de 96 index d'échantillons a été analysé à l'aide d'un test représentatif conçu pour étudier un seul gène couvrant 11 529 bases grâce à 8 échantillons d'ADN unique pour vérifier la capacité du test à faire systématiquement un appel de génotypage pour un échantillon donné à travers des combinaisons différentes de primers d'indexage. Chaque échantillon a été analysé avec 12 combinaisons différentes de primers d'indexage. Quarante-huit (48) combinaisons d'index ont été testées en une seule analyse de séquençage. Les résultats des échantillons ont été comparés aux données de séquençage bidirectionnel de Sanger pour l'ensemble des positions/variants. La reproductibilité et la précision ont été de 100 % pour toutes les combinaisons de primers d'indexage/échantillon.

Brevets et marques commerciales

Ce document et son contenu sont exclusifs à Illumina, Inc. et ses sociétés affiliées (« Illumina »), et sont exclusivement destinés à l'usage contractuel de son client dans le cadre de l'utilisation du ou des produits décrits dans les présentes et à aucune autre fin. Ce document et son contenu ne seront utilisés ou distribués à aucune autre fin et/ou communiqués, divulgués ou reproduits d'aucune façon sans le consentement écrit préalable d'Illumina. Illumina ne cède aucune licence en vertu de son brevet, de sa marque de commerce, de son droit d'auteur, ou de ses droits en common law ni de droits similaires d'un tiers quelconque par ce document.

Les instructions contenues dans ce document doivent être suivies strictement et explicitement par un personnel qualifié et adéquatement formé de façon à assurer l'utilisation correcte et sûre du ou des produits décrits dans les présentes. Le contenu intégral de ce document doit être lu et compris avant d'utiliser ces produits.

LE MANQUEMENT À LIRE COMPLÈTEMENT ET À SUIVRE EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LES PRÉSENTES POURRA CAUSER DES DOMMAGES AUX PRODUITS, DES BLESSURES AUX PERSONNES, UTILISATEURS OU AUTRES, ET DES DOMMAGES AUX AUTRES BIENS.

ILLUMINA REJETTE TOUTE RESPONSABILITÉ RÉSULTANT DE L'USAGE ABUSIF DU OU DES PRODUITS DÉCRITS DANS LES PRÉSENTES (Y COMPRIS LES PIÈCES DE RECHANGE DE CES PRODUITS OU LE LOGICIEL) OU DE TOUTE UTILISATION DE CE(S) PRODUITS(S) QUI SORT DU CADRE DES LICENCES OU DES PERMISSIONS EXPRESSES ACCORDÉES PAR ILLUMINA EN RAPPORT À L'ACQUISITION DE CES PRODUITS PAR LE CLIENT).

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO

© 2012-2014 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

Illumina et **MiSeqDx** sont des marques de commerce ou des marques déposées d'Illumina, Inc. Les autres marques et noms contenus dans les présentes sont la propriété de leurs détenteurs respectifs.

AMPure, Beckman et Beckman Coulter sont des marques déposées ou des marques de commerce de Beckman Coulter, Inc.

Coordonnées

Illumina
San Diego, Californie 92122 États-Unis
+ (1) 800 809 ILMN (4566)
+(1) 858 202 4566 (en dehors de l'Amérique du Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

EC REP

Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH La Haye
Pays-Bas

Étiquette du produit

Reportez-vous à la légende des symboles livrée avec chaque trousse pour une référence complète aux symboles qui peuvent apparaître sur l'emballage et l'étiquetage du produit.